



Etude des mécanismes d'action d'une immunothérapie par un lipide A, seul ou associé à l'oxaliplatine, dans des modèles de cancers coliques

Cédric Seignez

► To cite this version:

Cédric Seignez. Etude des mécanismes d'action d'une immunothérapie par un lipide A, seul ou associé à l'oxaliplatine, dans des modèles de cancers coliques. Médecine humaine et pathologie. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOMU01 . tel-01202340

HAL Id: tel-01202340

<https://theses.hal.science/tel-01202340>

Submitted on 20 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
U.F.R. DE MEDECINE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

THESE

En vue de l'obtention du titre de

**DOCTEUR EN BIOLOGIE DE L'ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
ET DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

Soutenance publique le 18 septembre 2013
par

CEDRIC SEIGNEZ

**ETUDE DES MECANISMES D'ACTION D'UNE IMMUNOTHERAPIE
PAR UN LIPIDE A, SEUL OU ASSOCIE A L'OXALIPLATINE, DANS
DES MODELES DE CANCERS COLIQUES**

Membres du jury

Pr. Corinne Abbadie

Rapporteur

Pr. Yves Delneste

Rapporteur

Pr. Sylvie Demignot

Examineur

Pr. Christophe Borg

Examineur

Pr. Paul Catherine

Co-directrice de thèse

Pr. Jeannin Jean-François

Co-directeur de thèse

*« Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route
de la découverte »*

Louis Pasteur

*« N'allez pas là où le chemin peut mener, aller là où il n'y a pas de
chemin et laissez une trace »*

Ralph Waldo Emerson

Remerciements

Je remercie les membres de mon jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mes travaux de doctorat :

- Madame **Corinne Abbadie**, de l'Institut de Biologie de Lille
- Monsieur **Yves Delneste**, de l'Institut de Biologie en Santé d'Angers
- Madame **Sylvie Demignot**, du Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire de l'EPHE, au Centre de Recherche des Cordeliers
- Monsieur **Christophe Borg**, du Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, Inserm UMR 1098, Interaction Hôte-Greffon-Tumeur et Ingénierie Cellulaire et Génique
- Madame **Catherine Paul**, du Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers de l'EPHE, à l'Université de Médecine de Dijon
- Monsieur **Jean-François Jeannin**, du Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers de l'EPHE, à l'Université de Médecine de Dijon

Je souhaite remercier également :

L'ancien et le nouveau directeur du Centre de Recherche Inserm U866, **Eric Solary** et **Laurent Lagrost**.

Les membres passés et présents de mon équipe pour ces cinq années passées à vos côtés. Cinq années riches en moments intenses tant sur le plan scientifique, notamment lorsque les manip' fonctionnent enfin, lors de l'envoi des papiers,..., que du côté personnel, je pense notamment à tout ces petits déjeuners, à ces repas aux restaurants, à toutes ces naissances...

Ali, je vous remercie pour toutes vos idées, votre soutien et votre bonne humeur. Je vous souhaite bon courage dans les prochaines années au milieu de toutes ces femmes et beaucoup de réussite.

Jean-François, merci d'avoir trouvé mon parcours atypique intéressant et de m'avoir accepté dans votre équipe, j'ignore si vous vous doutiez alors que je serais encore dans vos pattes cinq ans plus tard. J'ai beaucoup appris à travers nos conversations, notamment à ne pas oublier les

patients qui placent beaucoup d'espoirs dans les travaux des chercheurs, que la recherche n'est pas un exercice solitaire et que la finalité de nos recherches n'est pas de publier des articles. Vos encouragements et vos conseils ont stimulé ma curiosité et ont initié ma réflexion sur ma vision de la recherche et les devoirs qui sont les miens en tant que futur chercheur (j'espère). Encore une fois, je vous adresse un très grand merci.

Catherine, c'est ton tour ! Le moment que tu attendais est arrivé, après cinq années de dur labeur, tu vas enfin être libérée de moi ! C'est difficile de te remercier en quelques mots de tout ce que tu m'as apporté durant ces années. Je pense qu'on a plutôt bien fonctionné tout les deux. De toi j'ai appris à rester motivé même quand les manip' ne fonctionnent pas, à trouver d'autre façon d'aborder les problèmes, à être plus rigoureux tant dans mes expériences que dans mes réflexions et argumentations. Bien que tu sois souvent débordée, j'ai toujours pu compter sur toi lorsque j'avais besoin de conseils, d'aide pour les manip' où simplement de parler. J'espère que nous continuerons à travailler ensemble à l'avenir à travers de fructueuses collaborations ! En attendant je te remercie pour toutes ces années, ces conseils et tous ces bons souvenirs.

Amandine, ma binôme horizontale... c'est à mon tour de te remercier. C'est toi qui m'a pris sous ton aile lorsque je suis arrivé dans l'équipe, toi qui a essayé tant bien que mal de me faire mettre ma blouse, mes gants et de ne pas renifler le premier produit venu pour l'identifier, toi qui m'a appris à manipuler et qui finalement m'a fait aimer être à la paillasse ! J'ai beaucoup de très bons souvenirs avec toi, les longues heures à l'animalerie à travailler avec nos rats, les soirées et les week-ends au labo, toutes les réunions « rats », où, même si nous étions sérieux et appliqués, les traits d'humour fusaient et où je prenais un malin plaisir à te faire râler de ta douce voix !!! Merci beaucoup pour tous ces moments, pour nos longues conversations sur le chemin du retour le soir, pour tes encouragements, pour ton soutien. Je te souhaite de t'épanouir dans ton nouveau boulot à Lyon avec ta petite famille.

Cindy, je t'adresse un très grand merci pour toute ton aide pour les manip' mais aussi et surtout pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Tes précieux conseils m'ont beaucoup aidé et tu as souvent réussi à m'éviter de faire des boulettes (je pense notamment aux contrôles que j'avais tendance à oublier) et tout ça avec le sourire. Les futur(e)s étudiant(e)s de l'équipe auront beaucoup de chance d'être formés par toi. Je te souhaite bon courage pour la suite et plein de bonnes choses à toi et à ta petite famille.

Léa, ma chère Léa à la voix si douce...que pourrais-je bien dire pour te faire râler encore un pti coup ? Je finis ma thèse et toi ton diplôme, nous allons donc partir « ensemble » du labo qui du coup va devenir beaucoup plus calme, ils vont s'ennuyer sans nous tu ne crois pas ? Tu es un pti bout de bonne femme plein de fraîcheur et d'énergie qui m'as beaucoup fais rire. Je te remercie pour tous ces bons moments de rigolade ma copine Léa. Je te souhaite beaucoup de réussite dans ta future thèse mais je ne me fais aucun soucis pour toi, malgré ce que tu pense, tu t'en sortiras très bien, tu n'as qu'une chose à faire, prendre confiance en toi.

Claire-Emmanuelle, tu as été la première étudiante que j'ai « encadrée », ma première « victime » et tu t'en es plutôt bien sortie. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi, merci pour ta patience quand je n'étais pas très clair pour t'expliquer le principe d'une technique, où je voulais aller, ...Merci pour ton sérieux, pour la qualité de ton travail, pour ta curiosité et pour ta bonne humeur. Bonne continuation miss.

Anne et Anne-Laure, les deux drôles de dames. Impossible de ne pas vous inclure dans mes remerciements ! Je vous dis un grand merci pour tout, pour nos différentes soirées, pour le karaoké qui reste pour moi un souvenir mémorable, pour toutes nos conversations sur le toit, pour votre soutien et votre aide dans mes moments difficiles. Si je suis arrivé aussi épanoui au bout de ces années de thèse, vous n'y êtes pas étrangères. Je vous souhaite à toute les deux beaucoup de réussite dans vos carrières respectives et beaucoup de bonheur dans vos vies personnelles.

Je voudrais également remercier **Arlette, Amandine, Audrey, André et Laurent Arnould** pour vos précieux conseils techniques. Grâce à vous, j'ai pu mener à bien tous ces marquages immuno(histo)logiques et faire les belles photos présentées dans cette thèse. Arlette, je te remercie aussi pour m'avoir initié à la cytométrie mais également pour toutes les gourmandises que tu nous as préparées et fais goûter et pour toute ta bonne humeur.

Merci à **Valérie**, à **Marc**, à **Anne** et à tous **les autres membres de l'animalerie** pour leur aide et leurs conseils pour toutes les expériences réalisées avec les rats et les souris. Evidemment merci à tous **les rats** et **les souris** pour leur participation importante à ces travaux.

Merci à tous *les membres des autres équipes* (trop nombreux pour être cités) avec qui j'ai interagis durant ces cinq ans.

Enfin,

Mika, un très grand merci pour ton soutien durant toutes ces années. Tu es pour moi un exemple de travail, d'acharnement et de persévérance et tu es l'ami vers qui je me tourne dans les bons comme dans les mauvais moments et sur qui je peux toujours pu compter. Merci d'avoir toujours été là, je te souhaite de réussir tout ce que tu entreprendras.

Olivier, comment ne pas te remercier alors que depuis un an tu m'encourage, me soutien, me supporte (et ce n'est pas une mince affaire), me calme dans mes moments de stress,...bref tu es génial. Le postdoc arrivant tu vas pouvoir souffler un petit peu, j'espère que tu ne t'ennuieras pas trop ! Encore merci pour cette année et vivement les prochaines...

Et les derniers mais non les moindres, je voudrais remercier *mes parents et mes sœurs*, qui ont toujours été à mes côtés, ont cru en moi et m'ont encouragé. Maman, Papa, Aline, Katie, cette fois c'est fini, je ne suis plus étudiant, je suis enfin arrivé au bout de toutes ces années et j'espère que vous serez fier de moi. Un immense merci à vous, je vous aime.

Table des matières

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.	LE CANCER	18
1.	POURQUOI S'INTERESSER AU CANCER ?.....	18
2.	QU'EST-CE-QUE LE CANCER ?.....	20
a)	<i>Le cancer à travers l'histoire.....</i>	<i>20</i>
b)	<i>Le cancer vu par la biologie</i>	<i>21</i>
II.	UN EXEMPLE DE DEVELOPPEMENT ET DE PROGRESSION	
	TUMORALE : LE CANCER DU COLON.....	24
III.	LES TRAITEMENTS DU CANCER DU COLON	28
1.	LA CHIRURGIE	28
2.	LES CHIMIOOTHERAPIES	28
IV.	LA SENESCENCE.....	30
1.	DECOUVERTE DE LA SENESCENCE	30
2.	MECANISMES D'INDUCTION DE LA SENESCENCE.....	30
3.	MODIFICATIONS INDUITES PAR LA SENESCENCE	33
a)	<i>Changements de la morphologie cellulaire</i>	<i>33</i>
b)	<i>Changements du phénotype sécrétoire</i>	<i>35</i>
c)	<i>Les effets délétères du SASP</i>	<i>35</i>
d)	<i>Le SASP et le renforcement de la sénescence</i>	<i>37</i>
e)	<i>Le SASP et l'activation du système immunitaire</i>	<i>37</i>
4.	L'UTILISATION DE LA SENESCENCE EN THERAPIE	40
V.	LE SYSTEME IMMUNITAIRE	42
1.	HISTOIRE DE L'IMMUNOLOGIE	42
2.	LES MECANISMES D'ACTIVATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE	43
a)	<i>Ehrlich et la théorie de la reconnaissance du « non-soi ».....</i>	<i>44</i>
b)	<i>Janeway et la « théorie du non-soi infectieux ».....</i>	<i>44</i>
c)	<i>Matzinger et « la théorie du danger ».....</i>	<i>45</i>
VI.	L'IMMUNOTHERAPIE	46

1.	HISTOIRE DE L'IMMUNOTHERAPIE	46
2.	LA DECOUVERTE DE LA MOLECULE ACTIVE DU MELANGE DE COLEY, LE LIPIDE A	47
3.	LE PRINCIPAL RECEPTEUR DES LIPIDES A, TLR4	49
4.	LES SIGNALISATIONS ASSOCIEES A L'ACTIVATION DE TLR4 PAR LA FIXATION DE LIPIDE A	50
5.	L'ACTIVATION DE L'IMMUNITE PAR LES LIPIDES A	52
6.	UN LIPIDE A SYNTHETIQUE, L'OM-174.....	53
VII.	LES NEUTROPHILES.....	55
1.	LES NEUTROPHILES ET L'IMMUNITE ANTI-INFECTIEUSE.....	55
a)	<i>Recrutement des neutrophiles au site infectieux</i>	55
b)	<i>Elimination des pathogènes par les neutrophiles</i>	57
c)	<i>Les neutrophiles, organisateurs d'une réponse immunitaire efficace ?</i>	59
2.	LES NEUTROPHILES ET LE CANCER, AMIS OU ENNEMIS ?	60
a)	<i>Les neutrophiles au service des tumeurs</i>	61
b)	<i>Les neutrophiles, une arme dans la lutte contre le cancer</i>	62
3.	LE GRANZYME B, PRESENT OU NON CHEZ LES NEUTROPHILES ?	65
a)	<i>Les éléments de la controverse</i>	65
b)	<i>Qu'est ce que le granzyme B ?</i>	66
 MATERIEL ET METHODES		
I.	CULTURE CELLULAIRE ET MODELES ANIMAUX.....	72
1.	CULTURE CELLULAIRE	72
a)	<i>La lignée PROb</i>	72
b)	<i>La lignée CT26</i>	72
2.	MODELES ANIMAUX DE TUMEURS	73
a)	<i>Modèle de carcinomatoses péritonéales chez le rat BD IX</i>	73
	<input type="checkbox"/> Immunothérapie par le lipide A seul	74
	<input type="checkbox"/> Immunothérapie combinée à une chimiothérapie	75
b)	<i>Modèle de tumeurs sous-cutanées chez la souris Balb/C</i>	76
c)	<i>Modèle de carcinomatoses péritonéales chez la souris Balb/C :</i>	77
II.	OBTENTION DE CELLULES TUMORALES CT26 SUREXPRIMANT LA SERPINE B9	78

III. ISOLEMENT ET CULTURE DES CELLULES IMMUNITAIRES	78
1. LES NEUTROPHILES	78
a) <i>Isolement à partir de la rate</i>	78
b) <i>Isolement à partir de la moelle osseuse</i>	79
c) <i>Purification des neutrophiles</i>	79
d) <i>Culture des neutrophiles</i>	80
2. LES MACROPHAGES	80
IV. DOSAGES ET CYTOTOXICITE.....	81
1. LYSÉ DES TUMEURS.....	81
2. LYSÉ DES CELLULES	81
3. DETECTION DES CYTOKINES PAR « CYTOKINE ARRAYS»	81
4. DETECTION DE PROTEINES PAR E.L.I.S.A.....	82
5. DOSAGE DES NITRITES PAR LE TEST DE GRIESS.....	82
6. TEST DE CYTOTOXICITE AU BLEU DE METHYLENE	83
V. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES.....	83
1. EXTRACTION ET AMPLIFICATION DES ARNs	83
a) <i>Extraction des ARNs</i>	83
<input type="checkbox"/> Extraction des ARN totaux avec le kit Qiagen	83
<input type="checkbox"/> Extraction des ARN totaux par le Trizol.....	84
b) <i>Amplification des ARNs</i>	84
<input type="checkbox"/> Amplification des ARNm avec les kits Qiagen RT-PCR « One-step »	84
<input type="checkbox"/> Amplification des ARNm en deux étapes	85
VI. IMMUNOMARQUAGES SUR COUPES DE TUMEUR OU SUR CELLULES	
.....	86
1. PROTOCOLES DE MARQUAGES PAR IMMUNOFLUORESCENCE	86
a) <i>Préparation des cellules</i>	86
b) <i>Immunomarquages</i>	87
2. PROTOCOLES DE MARQUAGES PAR IMMUNOHISTOLOGIE	87
a) <i>Fixation des tissus</i>	87
<input type="checkbox"/> Fixation en paraffine	87
<input type="checkbox"/> Fixation par congélation	89

b) Principe des marquages immunohistochimiques.....	89
c) Protocoles des marquages immunohistochimiques	90
3. PROTOCOLES DES MARQUAGES PAR IMMUNOHISTOFLUORESCENCE	91
4. PROTOCOLES DE DOUBLE MARQUAGES IMMUNOHISTOLOGIQUES	91
5. MARQUAGE TUNEL (TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE-MEDIATED dUTP NICK-END LABELLING).....	91
a) Principe.....	91
b) Protocole.....	92
6. MARQUAGE DES CELLULES SENESCENTES PAR LE DDAOG	92
a) Marquage de coupes de tissus fixés par congélation.....	93
b) Marquage de cellules.....	93
VII. PROTOCOLES DE COLORATIONS.....	93
1. COLORATION HEMALUN EOSINE SAFRAN (HES)	93
2. COLORATION DE MAY-GRÜNWARD GIEMSA (MGG)	94
a) Coloration des frottis sanguins.....	94
b) Coloration des tissus.....	95
3. COLORATION DE LA SA- β -GALACTOSIDASE	95
VIII. STATISTIQUES :	96

RESULTATS

1^{ère} Partie : rôle des neutrophiles et du granzyme B dans l'efficacité antitumorale d'une immunothérapie par un lipide A

I. LE LIPIDE A GUERIT LES RATS PORTEURS DE PETITES CARCINOMATOSES PERITONEALES D'ORIGINE COLIQUE	99
1. SURVIE DES RATS BD IX PORTEURS DE PETITES CARCINOMATOSES PERITONEALES	99
2. LE TRAITEMENT PAR LE LIPIDE A INDUIT LA DIMINUTION DE LA QUANTITE DE CELLULES TUMORALES.....	100
3. AUGMENTATION DU RECRUTEMENT DE CELLULES IMMUNITAIRES PERIPHERIQUES	101

II.	LE LIPIDE A INDUIT LE RECRUTEMENT, L'INFILTRATION ET L'ACTIVATION DE NEUTROPHILES AU SEIN DES TUMEURS	102
1.	AUGMENTATION DE LA CONCENTRATION EN CHIMIOATTRACTANTS DES NEUTROPHILES DANS LES TUMEURS DES RATS TRAITES PAR LE LIPIDE A.....	102
2.	AUGMENTATION DU RECRUTEMENT DES NEUTROPHILES DANS LES TUMEURS DES RATS TRAITES PAR LE LIPIDE A.....	105
3.	ACTIVATION DES NEUTROPHILES DANS LES TUMEURS DES RATS TRAITES PAR LE LIPIDE A	109
III.	LE LIPIDE A INDUIT LA MORT DES CELLULES TUMORALES A PROXIMITE DES NEUTROPHILES	110
1.	MISE EN EVIDENCE DE LA MORT PAR APOPTOSE DES CELLULES TUMORALES CHEZ LES RATS TRAITES PAR LE LIPIDE A	110
2.	LES CELLULES TUMORALES APOPTOTIQUES SONT A PROXIMITE DE NEUTROPHILES CHEZ LES RATS TRAITES PAR LE LIPIDE A	112
3.	LES NEUTROPHILES SONT IMPLIQUES DANS L'EFFICACITE ANTITUMORALE DE LE LIPIDE A	113
IV.	ROLE ET ORIGINE DU GRANZYME B DANS L'EFFICACITE ANTITUMORALE DU LIPIDE A	118
1.	LE GRANZYME B EST-IL RESPONSABLE DE LA MORT PAR APOPTOSE DES CELLULES TUMORALES ?.....	118
2.	QUELLES SONT LES CELLULES PRODUCTRICES DE GRANZYME B DANS LES TUMEURS DES RATS TRAITES PAR LE LIPIDE A ?	120
V.	LA PRODUCTION ET L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE DU GRANZYME B EST-ELLE MODULEE PAR LE LIPIDE A ?	123
1.	LE LIPIDE A PEUT-IL MODULER LA PRODUCTION DE GRANZYME B PAR LES NEUTROPHILES ?	123
2.	LE LIPIDE A INDUIT-IL LA LIBERATION DE GRANZYME B PAR LES NEUTROPHILES ?	125
3.	LE GRANZYME B PRODUIT PAR LES NEUTROPHILES EST-IL CYTOTOXIQUE POUR LES CELLULES TUMORALES <i>IN VITRO</i> ?	126

4.	LE GRANZYME B EST-IL IMPLIQUE DANS L'EFFET ANTITUMORAL DU LIPIDE A <i>IN VIVO</i> ?	127
VI.	L'INTERACTION DU LIPIDE A AVEC LE MICROENVIRONNEMENT	
	MODULE LA PRODUCTION DE GRANZYME B PAR LES	
	NEUTROPHILES.....	130
1.	MODULATION DU MICROENVIRONNEMENT PAR LE LIPIDE A.....	130
2.	ROLE DU MICROENVIRONNEMENT DANS LA LIBERATION DE GRANZYME B PAR LES	
	NEUTROPHILES :	132
2^{ème}	Partie : rôle de la sénescence dans l'efficacité antitumorale de la	
	combinaison oxaliplatine / lipide A	
I.	L'ASSOCIATION OXALIPLATINE / LIPIDE A GUERIT LES RATS	
	PORTEURS DE CARCINOMATOSES PERITONEALES D'ORIGINE	
	COLIQUE AVANCEES	135
1.	SURVIE DES RATS BD IX PORTEURS DE CARCINOMATOSES AVANCEES	135
2.	LE TRAITEMENT PAR LA COMBINAISON OXALIPLATINE / LIPIDE A INDUIT LA	
	DIMINUTION DE LA QUANTITE DE CELLULES TUMORALES.....	136
3.	MISE EN EVIDENCE DE LA MORT PAR APOPTOSE DES CELLULES TUMORALES CHEZ	
	LES RATS TRAITES	137
II.	L'OXALIPLATINE ET LA SENESCENCE	140
1.	L'OXALIPLATINE INDUIT LA SENESCENCE DE CELLULES DANS LES TUMEURS	140
	a) <i>Mise en évidence des cellules sénescents par coloration au X-Gal.....</i>	<i>140</i>
	b) <i>Mise en évidence des cellules tumorales sénescents par coloration au DDAO</i>	
	<i>141</i>	
	c) <i>Mise en évidence de la sénescence par analyse de l'expression de gènes</i>	
	<i>marqueurs</i>	<i>142</i>
2.	L'OXALIPLATINE INDUIT LA SENESCENCE DES CELLULES TUMORALES <i>IN VITRO</i> ..	143
	a) <i>Mise en évidence de la sénescence des cellules tumorales par la coloration au X-</i>	
	<i>gal 143</i>	
	b) <i>Mise en évidence de la sénescence des cellules tumorales par la coloration au</i>	
	<i>DDAO.....</i>	<i>145</i>

c) <i>Mise en évidence de la sénescence des cellules tumorales par analyse de l'expression de gènes marqueurs</i>	146
d) <i>L'oxaliplatine induit la sénescence de nombreuses lignées tumorales</i>	147
III. LA SÉNESCENCE ET LES NEUTROPHILES	148
1. LES CELLULES SÉNESCENTES INDUISENT-ELLES LE RECRUTEMENT DES NEUTROPHILES DANS LES TUMEURS DES RATS TRAITES PAR L'OXALIPLATINE ?.	149
a) <i>Les cellules sénescences expriment-elles les gènes des chimioattractants des neutrophiles in vitro ?</i>	149
b) <i>La sénescence module-t-elle l'expression et la production des chimioattractants des neutrophiles in vivo ?</i>	150
c) <i>La sénescence induit-elle le recrutement des neutrophiles dans les tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine ?</i>	152
2. QUEL EST LE PHENOTYPE DES NEUTROPHILES RECRUTES AU SEIN DES TUMEURS LORSQUE LES RATS SONT TRAITES PAR L'OXALIPLATINE ?	154
IV. LA SÉNESCENCE ET L'IMMUNOTHERAPIE :	156
1. LE TRAITEMENT PAR LA COMBINAISON OXALIPLATINE / LIPIDE A INDUIT LA DIMINUTION DE LA QUANTITE DE CELLULES SÉNESCENTES :	156
2. LES NEUTROPHILES PEUVENT-ILS ETRE IMPLIQUES DANS L'EFFICACITE ANTITUMORALE DE LA COMBINAISON OXALIPLATINE / LIPIDE A ?	157

DISCUSSION & PERSPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

Table des illustrations

Figure 1 : évolution de l'incidence et de la mortalité des cancers au cours des dix dernières années.....	19
Figure 2 : les six altérations à l'origine de la transformation tumorale de cellules saines.....	22
Figure 3 : les altérations à l'origine de la transformation tumorale de cellules saines et du développement des tumeurs	23
Figure 4 : les différents stades de développement des cancers du côlon.	25
Figure 5 : taux de survie à 5 ans en fonction du stade de développement du cancer du côlon	27
Figure 6 : structure de la molécule d'oxaliplatine.....	29
Figure 7 : Foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence.....	31
Figure 8 : les cibles, signaux et effecteurs connus de la sénescence cellulaire.....	33
Figure 9 : modifications morphologiques des cellules sénescents.	34
Figure 10 : mise en évidence de l'activité de la SA- β -Galactosidase	35
Figure 11 : l'inflammation chronique est une composante de la plupart des maladies liées au vieillissement.....	36
Figure 12 : les différents effets du SASP. La réponse des cellules au SASP dépend du contexte et du type cellulaire.....	39
Figure 13 : la sénescence, une nouvelle arme dans le traitement des cancers.	41
Figure 14 : quelques exemples de PRR et leurs principaux ligand.....	45
Figure 15 : origine et structure des lipopolysaccharides (LPS).....	48
Figure 16 : voies de signalisation de TLR4 MyD88-dépendante et MyD88-indépendante.....	51
Figure 17 : structure de l'OM-174	53
Figure 19 : mécanisme anti-infectieux des neutrophiles	58
Figure 20 : formation et recapture des NET par les neutrophile	59
Figure 24 : protocole de traitement par immunothérapie par le lipide A seul chez le rat BD IX.	74
Figure 25 : schéma des prélèvements.....	75
Figure 26 : protocole de traitement par immunothérapie par le lipide A associée à l'oxaliplatine chez le rat BD IX.	75
Figure 27 : protocole de traitement par immunothérapie par le lipide A chez la souris Balb/C.	76

Figure 28 : protocole de traitement par immunothérapie par le lipide A associée à l'oxaliplatine chez la souris Balb/C.....	77
Figure 29 : courbes de survie de rats porteurs de tumeurs coliques traités ou non par le lipide A.....	99
Figure 30 : marquage immunohistofluorescent des cellules tumorales au sein des nodules de rats traités ou non par le lipide A.	100
Figure 31 : coloration HES de coupes histologiques des tumeurs de rats traités ou non par le lipide A.....	101
Figure 32 : variations de la quantité des chimiokines CXCL1 et CXCL2 mesurées par « cytokine antibody arrays »	103
Figure 33 : variation de l'expression des gènes des chimiokines <i>cxcl1</i> et <i>cxcl2</i> dans les tumeurs de rats traités ou non par le lipide A.....	104
Figure 34 : marquage immunohistofluorescent des neutrophiles (vert) et des cellules tumorales (rouge) au sein de tumeurs de rats traités ou non par le lipide A	105
Figure 35 : proportion de neutrophiles au sein des tumeurs de rats traités ou non par le lipide A.....	106
Figure 36 : coloration de May-Grünwald Giemsa de coupes de tumeurs de rats traités ou non par le lipide A.....	107
Figure 37 : analyse des niveaux d'expression des gènes <i>ncf1</i> et <i>ncf2</i> spécifiques des neutrophiles	108
Figure 38 : marquages de l'arginase 1 et de l'iNOS exprimées par les neutrophiles dans les tumeurs de rats traités ou non pas le lipide A.....	109
Figure 39 : marquage T.U.N.E.L. réalisé sur des coupes de tumeurs de rats traités ou non par le lipide A.....	110
Figure 40 : marquage des cellules tumorales et de la caspase 3 clivée dans les tumeurs de rats traités ou non par le lipide A	111
Figure 41 : marquage des cellules tumorales apoptotiques et des neutrophiles dans les tumeurs de rats traités ou non par le lipide A.....	112
Figure 42 : courbes de croissance des tumeurs dans un modèle murin de tumeurs sous-cutanées d'origine colique.....	114
Figure 43 : marquage immunohistochimique des neutrophiles (brun / rouge) au sein de tumeurs de souris traitées ou non par le lipide A et le SB 225002	115

Figure 44 : courbes de croissance des tumeurs dans un modèle murin de tumeur sous-cutanée d'origine colique	116
Figure 45 : Marquage immunohistochimique des neutrophiles (brun / rouge) au sein des tumeurs de souris traitées ou non par le lipide A et les anticorps Ly6G et RB6-8C5.....	117
Figure 46 : marquage des cellules tumorales et du granzyme B dans les tumeurs de rats traités ou non par le lipide A.....	118
Figure 47 : marquage des cellules tumorales apoptotiques et du granzyme B dans les tumeurs de rats traités ou non par le lipide A.....	119
Figure 48 : marquage immunohistofluorescent des cellules NK, LT $\alpha\alpha$ et LT $\beta\beta$ dans les tumeurs de rats traités ou non par le lipide A.....	121
Figure 49 : marquage des neutrophiles et du granzyme B dans les tumeurs de rats traités ou non par le lipide A.....	122
Figure 50 : Neutrophiles spléniques isolés à partir de rats porteurs de tumeurs traités ou non par le lipide A.....	123
Figure 51 : marquage immunofluorescent du granzyme B synthétisé par des neutrophiles spléniques isolés de rats traités ou non par le lipide A et traités ou non <i>in vitro</i> par le lipide A.	124
Figure 52 : dosage par E.L.I.S.A. du granzyme B libéré par les neutrophiles	125
Figure 53 : évaluation de la cytotoxicité du granzyme B présent dans les surnageants de culture des neutrophiles.....	126
Figure 54 : évaluation de la cytotoxicité du granzyme B vis-à-vis de cellules CT26 surexprimant ou non la serpine B9.....	128
Figure 55 : courbes de croissance des tumeurs dans un modèle murin de tumeurs sous-cutanées d'origine colique.....	129
Figure 56 : détection par immunofluorescence de granzyme B dans les neutrophiles de rats contrôles.	130
Figure 57 : variation de l'expression des gènes de l' <i>IL-2</i> , <i>-12</i> , <i>-21</i> et de l' <i>IFN$\alpha\alpha$</i>	131
Figure 58 : dosage par E.L.I.S.A. du granzyme B libéré par les neutrophiles.	132
Figure 59 : courbes de survie de rats porteurs de tumeurs coliques traités ou non par l'association oxaliplatine / lipide A.....	135
Figure 60 : marquage immunohistochimique des cellules tumorales au sein des nodules de rats	136
Figure 61 : marquage T.U.N.E.L. réalisé sur des coupes de tumeurs de rats traités ou non..	137

Figure 62 : marquage immunohistofluorescent des cellules tumorales apoptotiques dans les tumeurs de rats traités ou non.....	138
Figure 63 : marquage T.U.N.E.L. réalisé sur des coupes de tumeurs de rats traités ou non par l'oxaliplatine.....	139
Figure 64 : coloration au X-gal des cellules sénescents dans les tumeurs de rats traités ou non par l'oxaliplatine	140
Figure 65 : coloration fluorescente des cellules tumorales sénescents dans les tumeurs de rats traités ou non par l'oxaliplatine.....	141
Figure 66 : variation de l'expression des gènes marqueurs de la sénescence <i>il-6</i> , <i>il-8</i> et <i>mmp3</i>	142
Figure 67 : coloration au X-gal de cellules tumorales sénescents traitées ou non par l'oxaliplatine.....	144
Figure 68 : coloration au DDAO de cellules tumorales traitées ou non par l'oxaliplatine	145
Figure 69 : variation de l'expression des gènes marqueurs de la sénescence <i>il-6</i> et <i>il-8</i>	146
Figure 70 : Coloration au X-gal de cellules tumorales sénescents traitées ou non par l'oxaliplatine.....	147
Figure 71 : variation de l'expression des gènes des chimioattractants de neutrophiles dans les cellules tumorales PROb et CT26 traitées ou non par l'oxaliplatine	149
Figure 72 : variation de l'expression des gènes des chimioattractants de neutrophiles	150
Figure 73 : variations de la quantité des chimioattractants des neutrophiles mesurées par « cytokine antibody arrays »	151
Figure 74 : marquage immunohistochimique des neutrophiles (rouge / brun) au sein de tumeurs de rats traités ou non par l'oxaliplatine	152
Figure 75 : variation de l'expression des gènes spécifiques des neutrophiles <i>ncf1</i> et <i>ncf2</i>	153
Figure 76 : marquage de l'iNOS exprimée par les neutrophiles dans les tumeurs de rats traités ou non par l'oxaliplatine	154
Figure 77 : marquage immunohistofluorescent des neutrophiles et du granzyme B dans les tumeurs de rats traités ou non par l'oxaliplatine	155
Figure 78 : coloration au X-gal des cellules sénescents dans les tumeurs de rats traités ou non	156
Figure 79 : marquage de l'iNOS exprimées par les neutrophiles dans les tumeurs de rats traités ou non	158

Figure 80 : marquage immunohistofluorescent des neutrophiles et du granzyme B dans les tumeurs de rats traités ou non.....	159
Annexe 1 : tableau des séquences des primers utilisés chez le rat.	192
Annexe 2 : tableau des séquences des primers utilisés chez la souris.....	193
Annexe 3 : tableau des anticorps utilisés pour les marquages immunologiques.....	194
Annexe 4 : dosage par E.L.I.S.A. des cytokines inflammatoires IFN γ IL-1 β et TNF α dans les tumeurs de rats traités ou non	195
Annexe 5 : dosage de la concentration de nitrite produite par les macrophages péritonéaux cultivés avec les milieux conditionnés de cellules CT26 contrôles ou sénescents et traités ou non par le lipide A	196

Liste des abréviations

5-FU : 5 FluoroUracile

ADCC : Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AEC : 3-Amino-9-EthylCarbazole

APC : Antigen Presentating Cell

APRIL : a proliferation-inducing ligand

Arg : Arginase

ARN : Acide RiboNucléique

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated protein

ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein

BCG : Bacille de Calmette-Guérin

BAFF : B-cell-activating factor

BLyS : B lymphocyte stimulator

CCL : Chemokine (C-C motif) Ligand

CD : Cluster of Differentiation

Cdk : Cyclin-dependent kinase

Chk : Check point protein

CTL : Cytotoxic T Cell

CXCL : C-X-C chemokine Ligand

CXCR : C-X-C chemokine Receptor

DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern

DAPI : 4',6'-DiAmidino-2-PhenylIndole

DDAO : 7-hydroxy-9H(I,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one)

DDAOG : 9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one-7-yl) β -D-galactopyranoside

DDR : DNA Damage Response

dNTP : deoxyNucleotide TriPhosphate

E.L.I.S.A. : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

EDTA : Ethylen Diamine Tetraacetic Acid

GAPDH : GlycérAldéhyde-3-Phosphate DesHydrogénase

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HES : Hémalun Eosine Safran

HMGA : High Mobility Group A protein

HSP : Heat Shock Protein

ICAM : InterCellular Adhesion Molecule

IFN : Interferon

IGFBP : Insulin-like Growth Factor Binding Protein

IL : Interleukine

IRAK : IL-1 Receptor Associated Kinase

IRF : Interferon Regulatory Factor

LBP : LPS Binding Protein

LFA : Leukocyte Function associated Antigen

LPS : LipoPolySaccharide

MAP : Mitogen-Activated Kinase

MCP : Monocyte Chemotactic Protein

MGG : May-Grünwald Giemsa

MIP : Macrophage Inflammatory Protein

MMP : Matrix MetalloProteinase

MPL : MonoPhosphoryl Lipid A

MyD88 : Myeloid Differentiation primary response protein 88

NCF : Neutrophil Cytosolic Factor

NET : Neutrophil Extracellular Traps

NF1 : NeuroFibromatosis-related protein

NFR : Nuclear Fast Red

NF- κ B : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK : Natural Killer

NO : Nitric Oxide

NOS : NO Synthase

NP-40 : Nonidet P40 (nonylphenoxy polyethoxy ethanol)

OCT : Optimum Cutting Temperature

PAF : Platelet-Activating Factor

PAI : Plasminogen Activator Inhibitor

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PARP : Poly-ADP Ribose Polymerase

PBS : Phosphate Buffer Solution

PFA : ParaFormAldéhyde

PI : Proteinase Inhibitor

PRR : Pattern Recognition Receptors

PSA : Pénicilline Streptomycine Amphotéricine

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog protein

Rb : Retinoblastoma protein

ROS : Reactive Oxygen Species

RPMI : Roswell Park Memorial Institut

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SAHF : Senescent Associated Heterochromatin Foci

SASP : Senescent-Associated Secretory Phenotype

SA- β -Gal : Senescent-Associated- β -Galactosidase

SPI : Serpin Protease Inhibitor

SVF : Sérum de Veau Foetal

T.U.N.E.L. : Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling

TAN : Tumor-Associated Neutrophils

TCR : T Cell Receptor

Tdt : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

TGF β : Transforming Growth Factor β

TIR : Toll IL-1 Receptor

TIRAP : TIR domain containing Adaptor Protein

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TRAF : TNF-Receptor Associated Factor

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

TRAM : TRIF related adaptor Molecule

TRIF : TIR domain containing adaptor protein inducing IFN β

UV : Ultra Violet

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le cancer

1. Pourquoi s'intéresser au cancer ?

Parce que c'est une question de santé publique !

On considère actuellement que 28 millions de personnes dans le monde vivent avec un cancer découvert dans les cinq dernières années. De plus, l'incidence du nombre de nouveaux cas de cancer détectés ne cesse d'augmenter. Ainsi en 2008 plus de 12 millions de nouveaux malades ont été diagnostiqués et on estime à près de 25 millions le nombre de nouveaux cas à l'horizon 2025. D'autre part, le cancer est responsable du décès de 7,6 millions de malades en 2008, ce qui en fait la troisième cause de mortalité par maladie dans le monde, après les maladies cardiovasculaires et les maladies infectieuses et parasitaires (*World Cancer Report 2008, IARC*).

En France, en 2011, l'incidence du cancer est de plus de 350 000 nouveaux cas diagnostiqués, avec une répartition d'environ 55% chez les hommes pour 45% chez les femmes. Les cancers les plus fréquents chez l'homme sont les cancers de la prostate (71 000 nouveaux cas), des poumons (27 500 nouveaux cas) et colorectaux (21 500 cas). Chez les femmes, c'est le cancer du sein qui est le plus fréquent (53 000 nouveaux cas) suivi des cancers colorectaux (19 000 cas) et des poumons (12 000 nouveaux cas). Il y a eu en France, en 2011, 147 500 décès imputables au cancer, avec une répartition par sexe sensiblement équivalente à celle de l'incidence des cancers. Ainsi, chez l'homme, 21 000 décès ont été enregistrés suite à un cancer des poumons, viennent ensuite les cancers colorectaux (9 200 décès) et de la prostate (8 700 décès). Chez la femme, bien que le taux de mortalité diminue depuis 15 ans, le cancer du sein reste en tête de la mortalité avec 11 500 décès, suivi des cancers colorectaux (8 300 décès) et des poumons (8 100 décès, avec une augmentation constante) (figure 1) (« *Dynamique d'évolution des taux de mortalité des principaux cancers en France* » Institut National du Cancer 2010 ; « *Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2011* » Rapport technique. Institut de veille sanitaire 2011).

Le cancer colorectal est donc le second cancer tous sexes confondus tant en terme d'incidence que de mortalité, c'est pourquoi le développement de nouvelles approches thérapeutiques présente un intérêt manifeste en terme de santé publique.

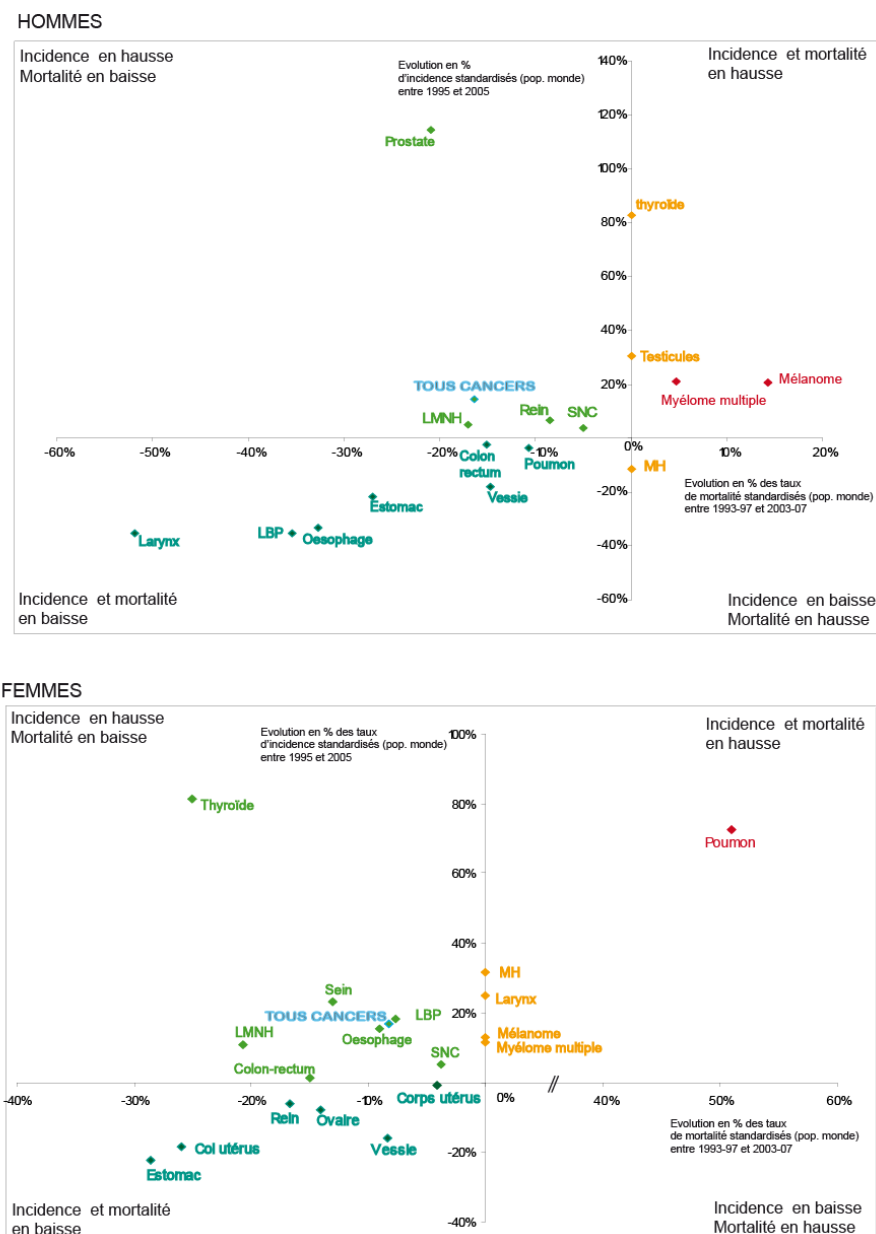


Figure 1 : évolution de l'incidence et de la mortalité des cancers au cours des dix dernières années. (INVS, CépiDC Inserm, INCa 2010. LMNH : Lymphome malin non hodgkinien, SNC : Système nerveux central, LLC : Leucémie lymphoïde chronique, LBP : Lèvre bouche pharynx, MH : Maladie de Hodgkin).

Mais avant d'aller plus loin dans la présentation des résultats obtenus durant ce doctorat, il importe de bien définir le sujet sur lequel ils portent.

2. Qu'est-ce-que le cancer ?

a) Le cancer à travers l'histoire

C'est au *père de la médecine* que l'on doit le terme *cancer*. En effet, on attribue au grec Hippocrate, qui vécut aux 5^{ème} et 4^{ème} siècles avant J.C., l'utilisation des termes *carcinos* et *carcinoma*, signifiant crabe, pour décrire des tumeurs. Hippocrate aurait utilisé ces mots à cause de la ressemblance entre la forme des tumeurs et celle de l'animal, les prolongements de la maladie lui rappelant les pattes du crustacé. Le médecin romain Celsus (1^{er} siècle av. J.C.) traduit le terme grec en *cancer*, l'équivalent latin de crabe.

Le cancer est souvent décrit comme étant une maladie liée à l'augmentation de l'espérance de vie des populations ainsi qu'à la dégradation de l'environnement et du mode de vie des individus. Ces phénomènes ne sont apparus que depuis le 19^{ème} siècle, pourtant des cas de cancer ont été décrits dès l'antiquité. En effet, les Egyptiens considéraient que le cancer était l'œuvre des dieux, alors que pour les Grecs la maladie était due au déséquilibre des différentes humeurs composant chaque corps. Ainsi une accumulation de bile noire dans certains sites de l'organisme conduisait à l'apparition d'une tumeur. Cette conception de l'origine des cancers a été popularisée par le célèbre médecin romain Galien et s'est transmise inchangée jusqu'au siècle des Lumières et les progrès dans la connaissance du fonctionnement du corps humain, grâce notamment aux premières autopsies, prohibées jusqu'alors pour des raisons religieuses.

Le médecin français Claude Gendron rejette les théories émises jusqu'au 17^{ème} siècle sur l'origine des cancers. Il postule que c'est la croissance d'une masse dure qui est à l'origine du cancer et que cette masse ne peut être traitée et doit être retirée avec tous ses « filaments ».

C'est à deux autres scientifiques français du 18^{ème} siècle, le médecin Jean Astruc et le chimiste Bernard Peyrilhe, que l'on doit les premiers travaux en oncologie expérimentale, une discipline qui a pour objectif d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes de développement, de diagnostic et de traitement des cancers.

L'invention du microscope à la fin du 19^{ème} siècle va révolutionner la compréhension de l'origine des cancers. En effet, les chercheurs découvrent alors qu'au sein des tumeurs, les

cellules présentent des différences importantes avec celles des tissus sains périphériques. Les recherches vont alors se concentrer sur l'origine de ces cellules et leur influence sur la maladie.

Depuis le début du 20^{ème} siècle différentes causes à l'origine du développement des cancers ont été identifiées. Ainsi en 1911, l'origine virale d'un cancer du poulet est mise en évidence. De même, des agents chimiques et physiques sont qualifiés de carcinogènes. En un siècle, le nombre de causes et de composés carcinogènes identifiés a augmenté de manière exponentielle et des réglementations de plus en plus strictes ont été mises en place afin de limiter les conséquences de l'utilisation de ces agents en termes de santé publique. Mais si des événements extrinsèques peuvent être à l'origine du développement de cancer, il existe également des causes intrinsèques, propres à chaque individu, qui peuvent conduire à l'apparition de tumeurs.

b) Le cancer vu par la biologie

Il est maintenant nécessaire d'aborder ce qu'est le cancer d'un point de vue biologique. A l'origine de tout cancer il y a une cellule dite *transformée*, c'est-à-dire une cellule qui a subi des agressions ou des dommages à son ADN, qui va proliférer de manière intensive, transmettre ces altérations lors de ses divisions successives et être à l'origine d'une tumeur qui en se développant détruit progressivement le tissu dans lequel elle est apparue. Deux phénomènes peuvent être à l'origine de l'altération de l'ADN d'une cellule, une erreur lors de la réplication de l'ADN et l'action de facteurs externes environnementaux tels que des agents chimiques (l'arsenic contenu dans la fumée de cigarettes, ...), physiques (rayonnement UV, ...) ou bien encore l'infection par des virus (papillomavirus dans le cas des cancers du col de l'utérus, ...). Dans une cellule saine les mutations sont corrigées par des systèmes de réparation de l'ADN qui semblent défectueux dans les cellules transformées dans lesquelles on observe l'accumulation de mutations. Durant son processus de transformation, la cellule cancéreuse échappe progressivement à plusieurs systèmes de régulation de la prolifération et de l'homéostasie des cellules saines. Dans une revue publiée en 2000 dans *Cell*, Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg ont proposé 6 altérations de la physiologie cellulaire nécessaires à la transformation d'une cellule saine en cellule tumorale : 1) l'autosuffisance en signaux de croissance, 2) l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, 3)

l'échappement aux programmes de mort cellulaire, 4) la capacité à proliférer indéfiniment, 5) la capacité à induire l'angiogénèse et 6) la capacité à envahir les tissus et à former des métastases (figure 2) (Hanahan & Weinberg, 2000).

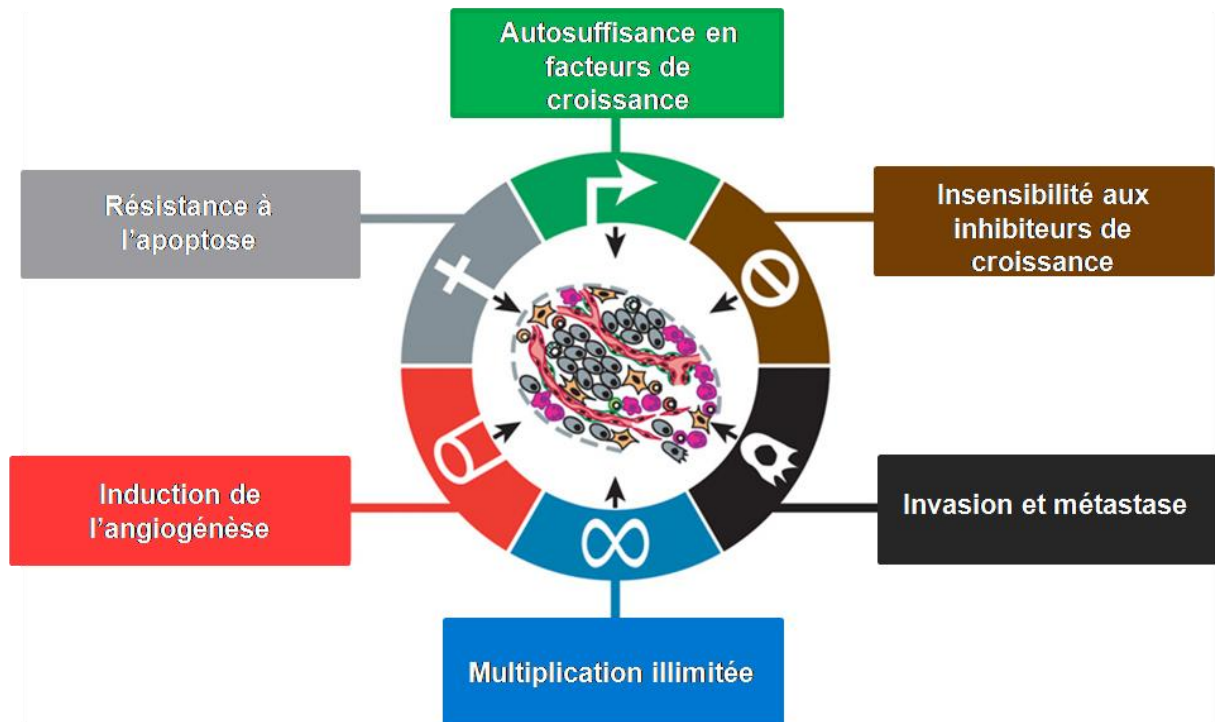


Figure 2 : les six altérations à l'origine de la transformation tumorale de cellules saines (d'après Hanahan & Weinberg, 2000). La plupart des cellules tumorales, sinon toutes, acquièrent ces caractéristiques durant leur développement, bien que les mécanismes impliqués puissent différer d'une cellule à l'autre.

Cependant grâce aux progrès réalisés durant la dernière décennie dans la compréhension du développement des tumeurs, les auteurs ont été amenés à proposer un schéma révisé et enrichi dans lequel les relations des cellules tumorales avec le microenvironnement dans lequel elles prolifèrent sont mieux prises en compte. En effet, il est maintenant bien admis que les cellules tumorales interagissent fortement avec les cellules composant le stroma (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules immunitaires,...) afin qu'elles soutiennent et facilitent la croissance de la tumeur. Actuellement, quatre caractéristiques supplémentaires sont à prendre en compte dans l'étude et la compréhension de la biologie des tumeurs : 7) la capacité à éviter la reconnaissance et la destruction par les cellules immunitaires, 8) l'induction d'un microenvironnement inflammatoire chronique, 9) l'apparition d'une

instabilité génomique importante, 10) la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire (figure 3) (Hanahan & Weinberg, 2011).

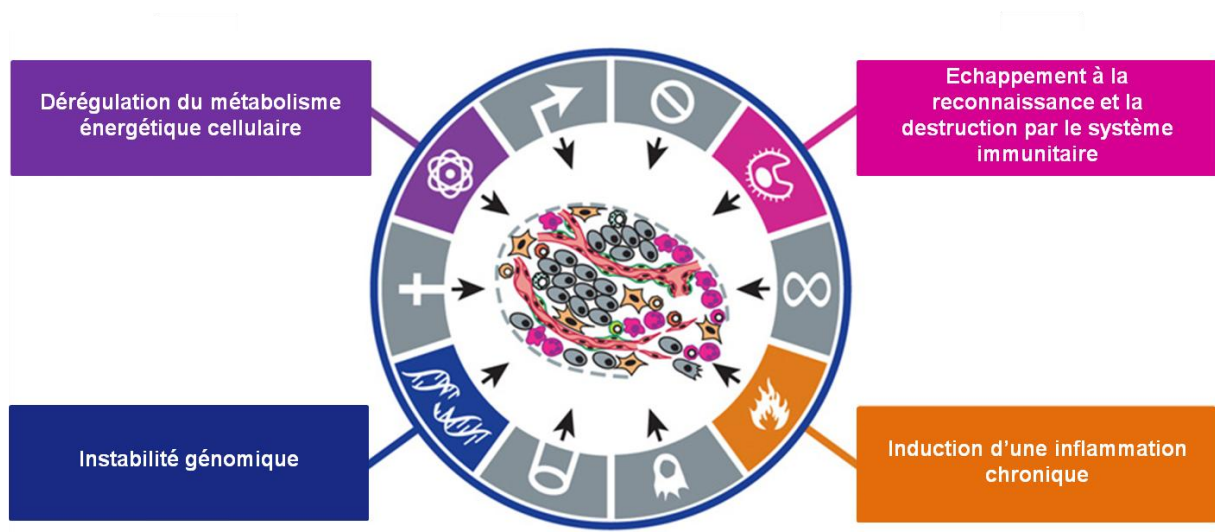


Figure 3 : les altérations à l'origine de la transformation tumorale de cellules saines et du développement des tumeurs (d'après Hanahan & Weinberg, 2011). Deux nouvelles caractéristiques en plus de celles décrites figure 2 sont impliquées dans le développement des cancers : la capacité à reprogrammer le métabolisme cellulaire afin d'augmenter la prolifération des cellules et la capacité à échapper à la reconnaissance et à la destruction par les cellules immunitaires. L'acquisition par les cellules des six capacités décrites précédemment et des deux nouvelles décrites ici est favorisée par une importante instabilité génomique et le développement d'un microenvironnement inflammatoire chronique.

La tumeur est désormais considérée comme un véritable tissu qui se développe au dépend de l'organe dans lequel elle est apparue. Cependant, lorsque la tumeur progresse, des cellules cancéreuses peuvent se détacher de la masse primaire, s'infiltrer à travers les cellules endothéliales, passer dans la circulation sanguine ou lymphatique et essaimer en tumeurs secondaires, appelées métastases, un peu plus loin dans le même tissu ou dans d'autres organes. On parle alors de tumeurs dites agressives.

II. Un exemple de développement et de progression tumorale : le cancer du côlon

Le cancer du côlon est le deuxième cancer le plus fréquent en termes d'incidence et de mortalité et survient principalement après 50 ans. Le côlon est la partie terminale du tube digestif et se situe dans l'abdomen où il mesure environ 1m50.

C'est dans la muqueuse, qui est la partie la plus interne de la paroi du côlon, que se développent le plus fréquemment les tumeurs. Il s'agit d'excroissances appelées polypes dont certains n'évolueront pas et resteront bénins (polypes hyperplasiques, hamartomateux et inflammatoires) alors que d'autres, les polypes adénomateux ou adénomes, vont évoluer progressivement en cancer. C'est derniers sont à l'origine de plus de 80% des cancers colorectaux. La transformation d'un adénome en cancer est lente et progressive et nécessite en moyenne 10 à 15 ans. Il existe quatre types d'adénomes qui sont l'adénome tubuleux, le plus fréquent (75% des polypes adénomateux) et le moins susceptible d'évoluer vers un cancer, l'adénome villositaire (5% des adénomes) qui présente un risque élevé de se transformer en cancer, l'adénome tubulovillositaire (20% des polypes adénomateux) qui présente des caractéristiques intermédiaires entre les deux précédemment cités et donc un risque médian. Dans les années 80 un quatrième type d'adénome a été identifié, l'adénome plan, qui correspond à une lésion localisée qui se développe à plat plutôt qu'en relief et présente un risque plus important que les autres adénomes d'évoluer vers un cancer.

L'âge est le facteur de risque le plus important à l'origine de l'apparition de polypes, néanmoins les personnes avec des antécédents familiaux de polypes présentent un risque accru par rapport à la population générale.

Habituellement asymptomatique, les polypes sont en général détectés dans le cadre du programme de dépistage organisé du cancer du côlon ou grâce à un suivi médical régulier dans les cas d'antécédents familiaux. Afin d'éviter une évolution vers un cancer, les polypes sont retirés par chirurgie. Deux types d'interventions sont envisageables en fonction de la nature du polype détecté, une polypectomie réalisée au cours d'une coloscopie au moyen d'une anse métallique flexible ou une ablation d'une partie du côlon.

Lorsque les adénomes ont évolué vers un cancer on parle alors d'adénocarcinome. Ce terme vient du grec adéno signifiant glande et carcino cancer. En effet, dans 95% des cas, les cancers coliques se développent à partir des glandes de Lieberkühn qui tapissent la partie

interne de la paroi du côlon et du rectum. Dans un premier temps les cellules cancéreuses sont localisées et peu nombreuses, seule la muqueuse est atteinte. Puis la tumeur grossit, s'étend dans la sous-muqueuse, la musculuse puis la séreuse. Quelques cellules peuvent se décrocher de la masse primaire et envahir d'autres organes, d'abord les ganglions lymphatiques qui sont à proximité de la tumeur, puis les organes tels que le foie et les poumons, qui sont les sites préférentiels de métastases des cancers du côlon (figure 4).

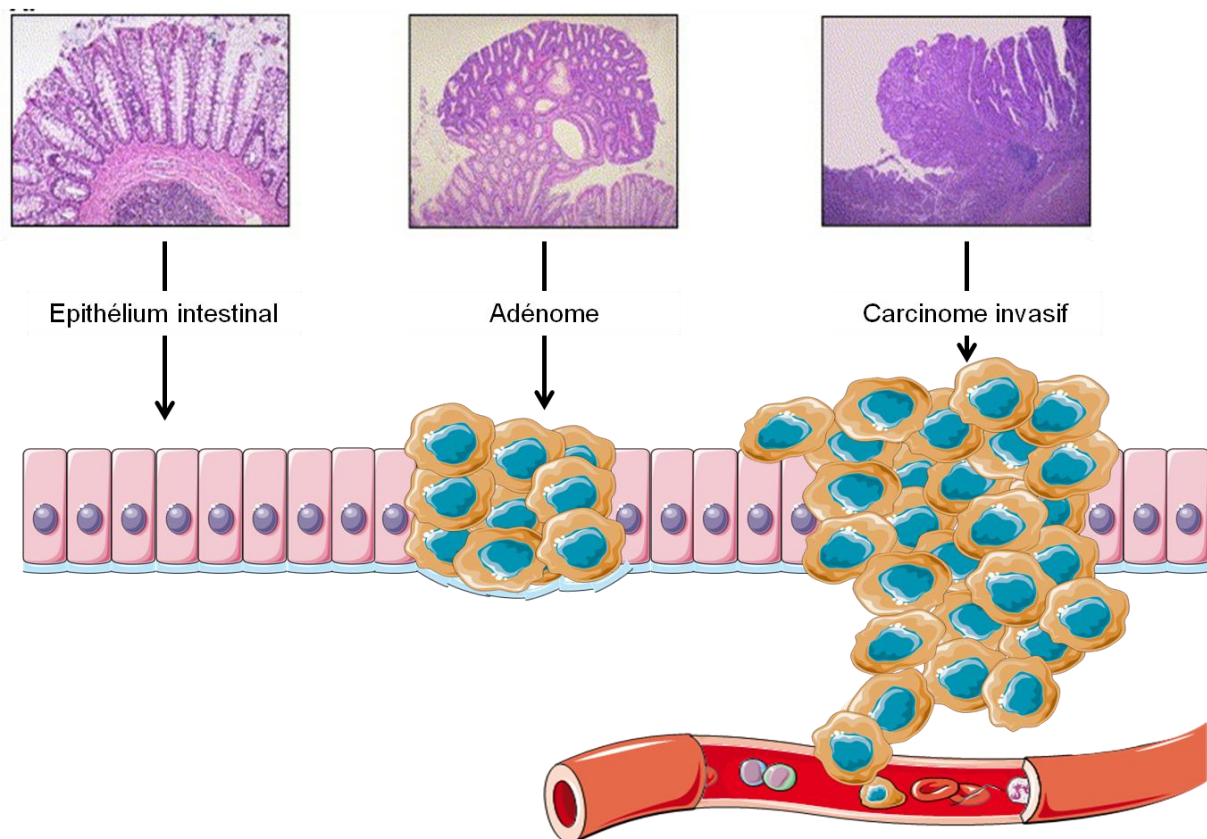


Figure 4 : les différents stades de développement des cancers du côlon. Les cancers du côlon se développent dans un premier temps à partir de la prolifération anarchique dans la muqueuse de cellules transformées qui vont former un polype adénomateux. L'évolution du cancer se fait par envahissement par les cellules tumorales des couches cellulaires situées sous la muqueuse, on parle alors d'adénocarcinome qui va progresser en carcinome invasif lorsque les ganglions lymphatiques et d'autres organes sont colonisés par des cellules tumorales qui vont alors former des métastases.

Afin de déterminer le type de prise en charge à proposer au malade, il est nécessaire d'évaluer le stade de développement du cancer. Pour cela trois critères sont pris en compte, la taille et la profondeur de la tumeur, l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques et la présence de métastases. Une classification en cinq stades et basée sur ces trois critères,

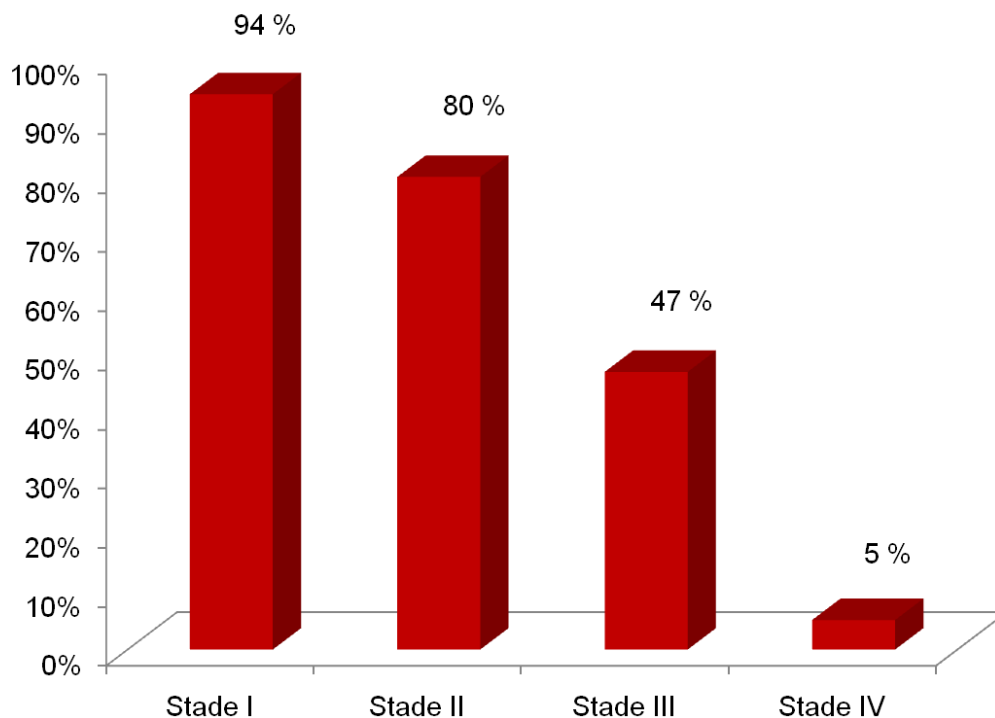
appelée classification TNM (Tumor, Nodes, Metastasis) est utilisée pour déterminer l'avancement du cancer.

Le stade 0 correspond à une tumeur superficielle localisée à la muqueuse, sans atteinte des tissus sous-jacents ni des ganglions lymphatiques et sans métastase.

Les stades 1 et 2 correspondent à une atteinte des différentes couches constituant la paroi du côlon mais pas des ganglions lymphatiques et sans métastase.

Dans le stade 3, des cellules cancéreuses ont envahi les ganglions lymphatiques et au stade 4 on observe la présence de métastase dans un organe éloigné du côlon, généralement le foie et/ou les poumons.

Depuis 2008, il a été mis en place en France un programme de dépistage organisé du cancer colorectal pour les personnes âgées de 50 à 74 ans qui sont invitées à réaliser tous les deux ans un dépistage basé sur la détection de sang dans les selles par le test Hémoccult. Une étude contrôlée en population générale a montré une réduction de 16% de la mortalité par cancer colorectal après 11 ans de suivi (Faivre et al., 2004; Kronborg et al., 1996). En effet, la détection des cancers colorectaux à un stade précoce permet une meilleure prise en charge des patients et une augmentation significative du taux de survie à 5 ans des malades (figure 5).



Taux de survie à 5 ans des malades

Figure 5 : taux de survie à 5 ans en fonction du stade de développement du cancer du côlon (Institut National de Veille Sanitaire, 2008). Lorsque les patients sont pris en charge alors que le cancer est encore localisé dans la paroi du côlon (stade I et II), l'exérèse chirurgicale, complétée le cas échéant par une chimiothérapie adjuvante, permet d'atteindre un taux de survie à cinq ans de plus de 80 %. En revanche, lorsque la maladie commence à envahir les ganglions lymphatiques (stade III), l'efficacité des traitements est fortement diminuée puisque seul un patient sur deux est encore en vie cinq ans plus tard. Le pronostic est encore plus sombre lorsque la maladie est diagnostiquée à un stade métastatique (stade IV).

III. Les traitements du cancer du côlon

C'est le stade de développement de la maladie qui conditionne en grande partie le type de traitement proposé au malade.

1. La chirurgie

L'ablation chirurgicale est le traitement standard en cas de cancer du côlon, elle consiste à retirer la portion de côlon atteinte par la tumeur ainsi que les ganglions lymphatiques sous-jacents (on parle de curage ganglionnaire). Afin de limiter les risques de récidives, l'exérèse chirurgicale comprend la tumeur ainsi que du tissu sain adjacent.

La chirurgie est suffisante dans les cas de cancers du côlon de stade 0 et 1 où le risque de propagation de cellules est très faible. Dans les cas de cancers du côlon plus avancés, une chimiothérapie peut être proposée.

2. Les chimiothérapies

Utilisée pour réduire les risques de récidives, notamment en cas de tumeurs présentant des caractéristiques agressives, la chimiothérapie adjuvante est proposée en complément de la chirurgie. Il s'agit d'un traitement systémique qui a pour but de détruire ou de bloquer la prolifération des cellules cancéreuses. Il est administré généralement par perfusion ou par voie orale et est d'une durée variable, alternant des périodes de chimiothérapie appelées cures avec des périodes de repos permettant à l'organisme de récupérer. En effet, les drogues utilisées ne ciblent pas spécifiquement les cellules tumorales mais toutes les cellules en phase de prolifération. Ainsi les cellules saines telles que les cellules sanguines, des muqueuses,...sont également touchées par le traitement, ce qui est à l'origine des effets secondaires des chimiothérapies.

Les molécules de références utilisées en chimiothérapie des cancers du côlon sont le 5-fluorouracile associé à l'acide folinique, l'oxaliplatine et irinotecan (André et al., 2001; Grivicich et al., 2001).

Le 5-fluorouracile est un antimétabolite analogue de la pyrimidine. Il est transformé au sein des cellules en divers métabolites cytotoxiques qui sont incorporés aux acides nucléiques.

Le 5-fluorodésoxy-uracile monophosphate bloque l'activité de la thymidylate synthase, entraînant de fait l'arrêt du cycle cellulaire et la mort par apoptose de la cellule.

L'Irinotecan est un analogue semisynthétique d'un alcaloïde naturel, le camptothécine. Il est activé dans la cellule par hydrolyse en SN38 qui va inhiber l'action de la topoisomérase 1, bloquant la réplication et la transcription de l'ADN et conduisant à la mort de la cellule (Bleiberg, 1999).

L'oxaliplatine est un dérivé du platine de troisième génération composé d'un atome de platine complexé avec un cycle 1,2 diaminocyclohexane (DACH) et un groupement oxalate (figure 6).

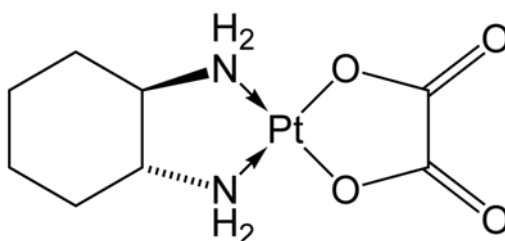


Figure 6 : structure de la molécule d'oxaliplatine.

C'est un agent alkylant qui inhibe la synthèse de l'ADN par formation de doubles adduits entre deux guanines adjacentes situées chacune sur un brin d'ADN différent (Grivicich et al., 2001; Wiseman et al., 1999).

L'oxaliplatine a obtenu son autorisation de mise sur le marché (A.M.M.) en 1996. Dès 1998, l'association 5-FU/Acide Folinique/Oxaliplatine (FOLFOX) a été autorisée comme traitement de première ligne thérapeutique dans les indications de cancers colorectaux (André et al., 2001; Raymond et al., 2001).

L'oxaliplatine a supplanté les molécules à base de platine de 1^{ère} et 2^{ème} génération car son profil d'activité est plus large que celui du cisplatine, ce qui lui permet d'être efficace sur les tumeurs résistantes au cisplatine. D'autre part, les effets secondaires associés à l'oxaliplatine sont moins importants, on observe notamment une absence de toxicité rénale et une faible toxicité hématologique. Cependant, des neuropathies souvent invalidantes, telles que dysesthésies aux extrémités, apparaissent fréquemment (Cassidy & Misset, 2002).

La plupart des thérapies antitumorales classiques agissent principalement par induction de dommages à l'ADN (Bartkova et al., 2006; Jackson & Bartek, 2009), ce qui induit l'activation

des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN (DNA damage response DDR) conduisant soit à la mort par apoptose des cellules lorsque les dommages sont trop importants, soit à l'arrêt de la croissance cellulaire le temps nécessaire à la réparation de l'ADN (Ciccia & Elledge, 2010; Riley et al., 2008).

Cependant, lorsque les cellules exposées à des agents cytotoxiques ne meurent pas par apoptose alors même que les mécanismes de DDR restent activés, elles peuvent entrer dans un état dit de « sénescence cellulaire » (Chang et al., 2002; Mirzayans et al., 2005). Ainsi, près de 42% des tumeurs réséquées après une chimiothérapie néoadjuvante chez des patientes atteintes de carcinomes mammaires présentent un marquage positif pour la sénescence (te Poele et al., 2002). Ces données ont ensuite été confirmées dans les cas de cancers des poumons non à petites cellules (Roberson et al., 2005), de cancers de la prostate (Coppé et al., 2008) et de mésothéliomes pleuraux malins (Lazzarini et al., 2008).

IV. La sénescence

1. Découverte de la sénescence

Le terme de sénescence vient du mot latin « *senex* » signifiant « âgé ». Il décrit un stade de la vie des organismes associé au vieillissement mais peut également être appliqué à un phénotype cellulaire, généralement lié à « l'âge avancé » de la cellule en termes de nombre de division cellulaire.

Le concept de sénescence cellulaire a été énoncé au début des années 1960 par Léonard Hayflick et Paul Moorhead qui avaient remarqué que des fibroblastes humains en culture pouvaient effectuer environ 55 doublements de leur population avant que leur prolifération ne soit stoppée définitivement (Hayflick, 1965; Hayflick & Moorhead, 1961).

2. Mécanismes d'induction de la sénescence

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de l'entrée en sénescence des cellules. Le raccourcissement des chromosomes consécutif à la perte d'ADN télomérique à chaque division cellulaire fut le premier décrit (Bodnar et al., 1998; Harley, Futcher & Greider, 1990), on parle alors de sénescence répllicative. C'est pour cette raison que chaque cellule, à

l'exception de celles exprimant la télomérase, ne peut se diviser qu'un nombre déterminé de fois. Cette capacité proliférative limitée est à l'origine du processus de vieillissement des organismes. L'érosion des télomères induit l'activation des kinases ATM et ATR, conduisant à la phosphorylation des histones H2AX (d'Adda di Fagagna et al., 2003) et à la formation de foyers d'hétérochromatine (Senescent-associated heterochromatine foci, SAHF) contenant les gènes associés à la prolifération cellulaire, permettant l'entrée en sénescence des cellules (Herbig et al., 2004; Rodier et al., 2009; Takai, Smogorzewska & de Lange, 2003). En effet, les promoteurs de ces gènes se trouvent au sein des SAHF et ne sont donc plus accessibles aux facteurs de transcription (Adams, 2007; Narita et al., 2003). Les SAHF sont caractérisés par leur déplétion en histone H1, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et l'enrichissement de ces structures en protéines γ H2AX et HMGA (figure 7) (Funayama et al., 2006; Narita et al., 2006; Zhang et al., 2005).

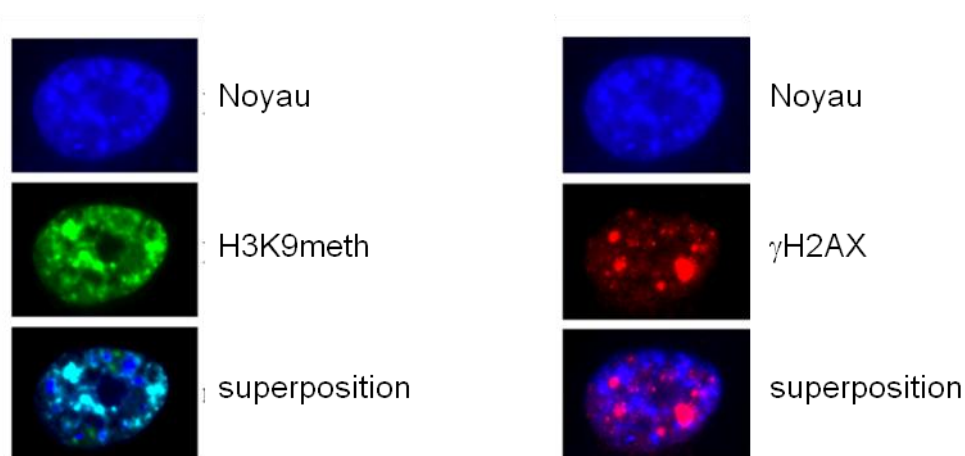


Figure 7 : Foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (d'après Becker et al 2013). Dans les cellules sénescentes de nombreux foyers d'hétérochromatine sont mis en évidence par le marquage de la méthylation de la lysine 9 des histones H3 (H3K9meth) et par la phosphorylation des histones H2AX (γ H2AX).

Enfin, il y a également activation des protéines de contrôle du cycle cellulaire, Chk1 et Chk2, et induction des protéines $p21^{CIP1}$ et $p16^{INK4a}$, entraînant l'arrêt du cycle cellulaire (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Gewirtz, Holt & Elmore, 2008).

Cependant, de nombreuses causes peuvent induire prématurément l'entrée en sénescence des cellules. En effet, l'exposition des cellules à un stress oxydatif soutenu engage une réponse similaire à celle observée lors de la sénescence répliative (Chen, Hales & Ozanne,

2007). Ainsi en 2005, Duan a montré que l'exposition chronique à de faibles doses de peroxyde d'hydrogène induit l'accumulation de dommages à l'ADN, la diminution de l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN et finalement la sénescence des cellules (Duan, Zhang & Tong, 2005).

L'activation d'oncogènes ou la perte d'activité de gènes suppresseurs de tumeurs peuvent également entraîner la sénescence des cellules. Ce processus permet de maintenir l'intégrité de l'organisme en limitant la prolifération des cellules transformées (Campisi, 2001), on parle alors de sénescence induite par les oncogènes (Oncogene induced senescence OIS). Ainsi, en 1997, Serrano montra que l'augmentation de l'expression de l'oncogène Ras, au lieu d'induire une prolifération accrue des cellules, provoquait un arrêt définitif de leur croissance due notamment à l'accumulation des protéines p53 et p16 (Serrano et al., 1997). Ces résultats ont été confirmés par Braig en 2005 qui montra que l'induction de Ras dans des lymphocytes induisait l'entrée en sénescence des cellules par activation de la protéine Rb (Braig et al., 2005). Depuis, l'implication de nombreux autres oncogènes dans l'induction de la sénescence a été démontrée (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Michaloglou et al., 2005; Zhuang et al., 2008). En outre, l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs PTEN et NF1 entraîne également l'activation des protéines p53 et p21 et la sénescence des cellules (Chen et al., 2005; Courtois-Cox et al., 2006).

De nombreuses causes peuvent induire l'entrée en sénescence des cellules mais il semble que, dans la plupart des cas, la cascade de signalisation impliquant les protéines ATM/p53/Rb soit engagée (figure 8) (Caino, Meshki & Kazanietz, 2009; Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Courtois-Cox, Jones & Cichowski, 2008).

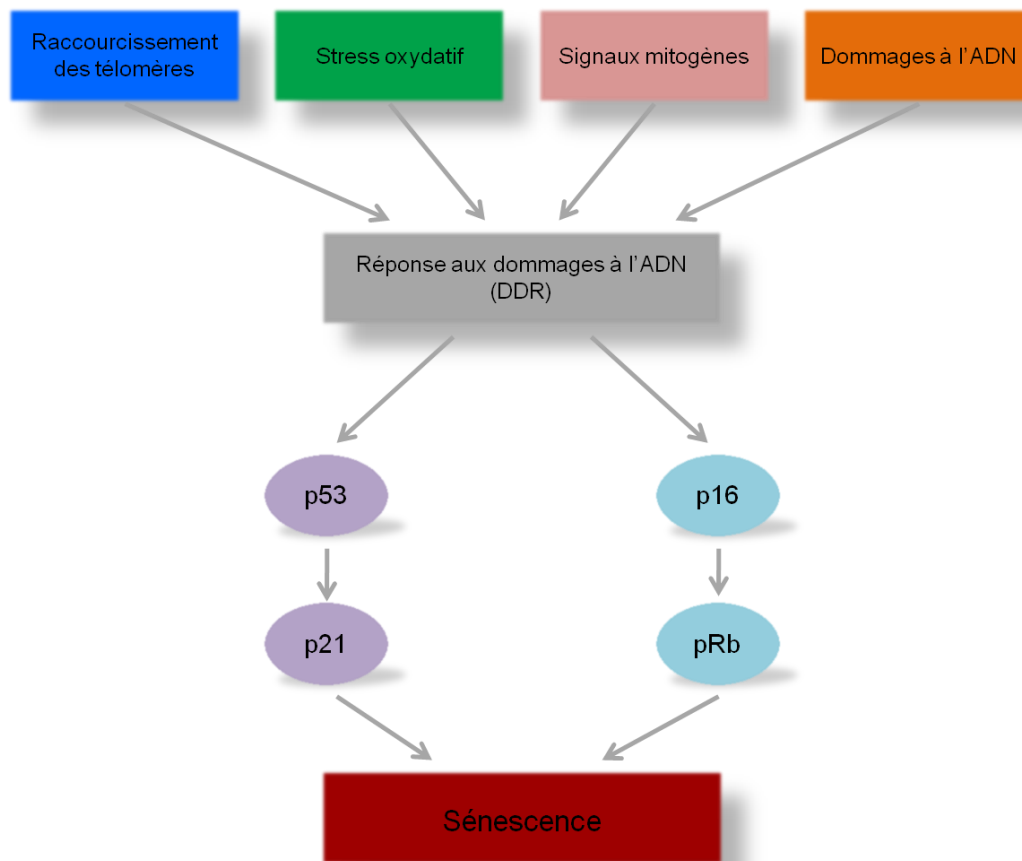


Figure 8 : les cibles, signaux et effecteurs connus de la sénescence cellulaire. Le phénotype sénéscent est induit par de nombreux stimuli, notamment le raccourcissement des télomères et leurs dysfonctionnements. D'autres stimuli tels que l'apparition de dommages à l'ADN non télomérique peuvent être dus aux rayonnements (rayons-X et UV), aux stress oxydatifs, aux signaux mitogènes provoqués par l'activation d'oncogènes et à des stress non génotoxiques tels que des changements épigénétiques qui vont perturber la structure de la chromatine. La réponse des dommages à l'ADN est alors activée, conduisant à l'activation des voies p53/p21 et p16/pRb et induisant l'entrée en sénescence de la cellule.

3. Modifications induites par la sénescence

a) **Changements de la morphologie cellulaire**

Les cellules sénéscentes présentent différentes caractéristiques morphologiques permettant de les distinguer des cellules normales. Ainsi, on observe une augmentation très importante de la taille, due notamment à l'accumulation de vacuoles cytoplasmiques consécutive au

métabolisme très important de ces cellules, de la granularité des cellules ainsi qu'une apparence aplatie (figure 9).

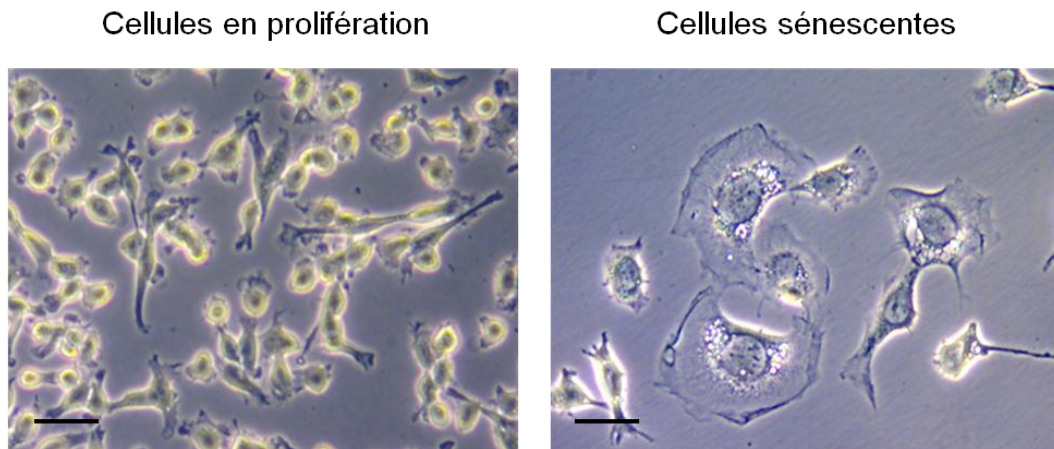


Figure 9 : modifications morphologiques des cellules sénescences. Les cellules sénescences présentent une apparence aplatie ainsi qu'une augmentation très importante de leur taille et de leur granulosité (cellules B16F10 traitées ou non pendant 8 jours par 10 μ M d'oxaliplatine).

En plus des changements morphologiques, l'activité d'une enzyme lysosomale, la senescent-associated- β -galactosidase (SA- β -Gal), est augmentée (Collado & Serrano, 2010) et peut être mise en évidence par l'accumulation d'un précipité bleu lorsque les cellules sont incubées avec une solution de X-gal (figure 10) (Dimri et al., 1995).

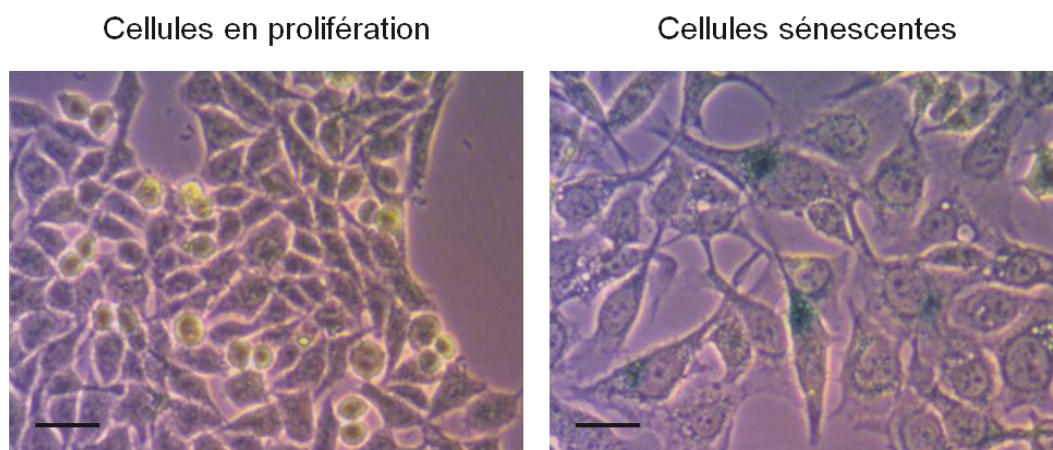


Figure 10 : mise en évidence de l'activité de la SA- β -Galactosidase. Les cellules sénescentes présentent une augmentation de l'activité de la SA- β -Galactosidase mise en évidence par l'accumulation d'un précipité bleu dû à la dégradation du composé chromogène X-gal (cellules HCT116 traitées ou non pendant 8 jours par 10 μ M d'oxaliplatine).

b) Changements du phénotype sécrétoire

La réorganisation de la structure de la chromatine est à l'origine de l'induction d'un phénotype sécrétoire associé à la sénescence, aussi appelé SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype). Le concept de SASP a été initialement proposé par le groupe de Judith Campisi qui montra que des facteurs sécrétés par des fibroblastes sénescents favorisent la transformation de cellules épithéliales mammaires pré-malignes mais pas de cellules normales (Krtolica et al., 2001; Parrinello et al., 2005). Nous allons voir plus loin qu'il est maintenant clairement démontré que de nombreux composants du SASP agissent aussi bien de manière paracrine, en altérant le microenvironnement tissulaire et en affectant les cellules voisines, que de manière autocrine, en contribuant à l'établissement et au renforcement de la sénescence.

c) Les effets délétères du SASP

Les cellules sénescentes produisent et sécrètent de nombreuses molécules, telles que des facteurs de croissance (Insulin-like growth factor binding protein IGFBP, IGFBP-2, -4,...) et des protéines de remodelage de la matrice extracellulaire (Matrix metalloproteinase MMP, MMP-3, -10,...) dont la libération peut altérer le microenvironnement tissulaire. En effet, la

libération de protéines de remodelage de la matrice extracellulaire va induire la dégradation de la structure des tissus et altérer leurs fonctions. Ainsi, la sécrétion de la protéine MMP-3 par les fibroblastes sénescents inhibe la différenciation morphologique et fonctionnelle des cellules épithéliales mammaires (Parrinello et al., 2005) et peut favoriser la croissance tumorale (Liu & Hornsby, 2007). De plus, en libérant des cytokines inflammatoires (Interleukine IL-6, IL-8,...) (Coppé et al., 2008; Kuilman et al., 2008) à l'origine d'une inflammation chronique stérile, la sénescence favoriserait l'apparition de maladies liées au vieillissement telles que des maladies cardiovasculaires (cardiomyopathie), neurodégénératives (Alzheimer), métaboliques (diabète de type 2) ou encore musculo-squelettiques (ostéoarthrite) (figure 11) (Freund et al., 2010). En effet, l'inflammation chronique induit le recrutement de cellules immunitaires et la production d'espèces réactives de l'oxygène à l'origine de la mort de cellules et de la désorganisation des tissus.

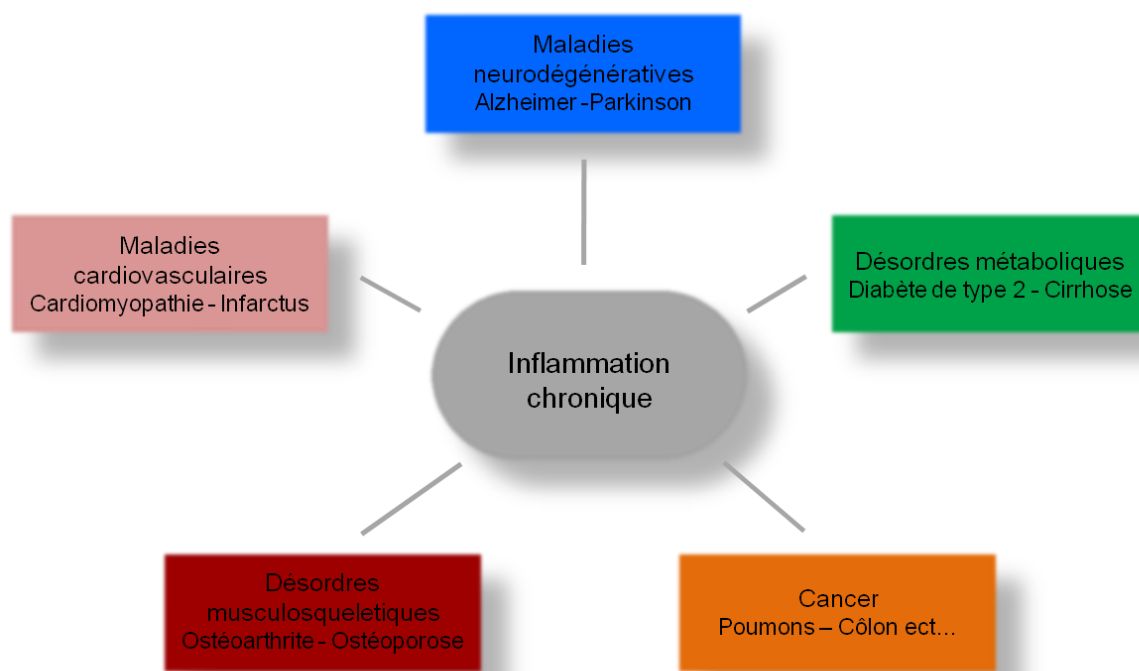


Figure 11 : l'inflammation chronique est une composante de la plupart des maladies liées au vieillissement. De très nombreuses maladies sont soit associées à une inflammation chronique soit ont une composante inflammatoire. Ainsi l'inflammation chronique est à l'origine de maladies cardiaques, de cancers, de désordres musculosquelettiques, de maladies neurodégénératives et de désordres métaboliques.

En outre, les dommages à l'ADN générés par le stress oxydant induisent la transformation tumorale des cellules qui échappent à la surveillance immunitaire du fait de l'inhibition des cellules immunitaires par l'inflammation chronique (Allavena et al., 2008; Grivennikov, Greten & Karin, 2010). De plus, le SASP favorise la progression tumorale en stimulant la prolifération et la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules tumorales, favorisant le développement de métastases ainsi que l'angiogénèse au sein des tumeurs (figure 12) (Coppé et al., 2006; Thiery et al., 2009).

d) Le SASP et le renforcement de la sénescence

De nombreuses études ont également démontré l'effet bénéfique des molécules composant le SASP sur l'induction et le renforcement de la sénescence de cellules. Ainsi, en 2000, Tremain montra que l'inhibition de la signalisation du TGF β dans des kératinocytes murins transformés par l'introduction du gène v-ras permet aux cellules d'échapper à la sénescence et de continuer à proliférer, démontrant pour la première fois que la sénescence peut être modulée par des facteurs sécrétés (Tremain et al., 2000). En 2006, Kortlever montra l'implication de la protéine sécrétée PAI1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) dans l'induction et le maintien de la sénescence (Kortlever & Bernards, 2006; Kortlever, Higgins & Bernards, 2006). Puis en 2008, trois études vinrent renforcer l'idée que la sénescence peut être contrôlée par des facteurs sécrétés. En effet, Wajapeyee démontra l'implication de la protéine IGFBP7 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7) dans l'entrée en sénescence de mélanocytes surexprimant la protéine BRAF (Wajapeyee et al., 2008). L'équipe de Kuilman mis en évidence le rôle de l'IL-6 et de l'IL-8 dans l'induction de la sénescence et d'un microenvironnement inflammatoire (Kuilman et al., 2008). Enfin, Acosta montra l'implication de la signalisation via le récepteur CXCR2 dans le renforcement de la sénescence (Acosta et al., 2008a; Acosta et al., 2008b).

e) Le SASP et l'activation du système immunitaire

Depuis 2007, des travaux ont mis en évidence l'implication du système immunitaire stimulé par le SASP dans l'élimination des cellules sénescents. En effet, en 2007, Xue a démontré que la réactivation de la protéine p53 dans des cellules de carcinome hépatique induit l'entrée en sénescence des cellules tumorales, la sécrétion de protéines du SASP, le

recrutement dans les tumeurs de cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles et cellules NK) et *in fine* une régression tumorale complète (Xue et al., 2007).

Puis en 2008, Valery Krizhanovsky démontra que l'élimination de cellules stellaires hépatiques sénescents par les cellules NK limite le développement d'une fibrose hépatique (Krizhanovsky et al., 2008). La même équipe récidive en 2012 en montrant que c'est la libération du granzyme B contenu dans les granules cytotoxiques des cellules NK qui permet l'élimination des cellules stellaires hépatiques sénescents (Sagiv et al., 2013).

C'est ensuite au tour des macrophages d'être impliqués dans la surveillance et l'élimination des cellules sénescents. Dans un article publié dans Cell en avril 2013 Amaia Lujambio montre que la protéine p53 peut agir non seulement en induisant l'entrée en sénescence de cellules stellaires hépatiques mais également en modulant la fonction des macrophages au moyen de facteurs sécrétés, permettant le développement d'un microenvironnement antitumoral dans lequel les macrophages de type M1 (antitumoral) élimine les cellules sénescents (Lujambio et al., 2013).

Enfin, l'élimination d'hépatocytes pré-tumoraux sénescents nécessite le développement d'une réponse immunitaire adaptative orchestrée par les cellules T CD4+ (Kang et al., 2011).

Ainsi, un des rôles majeurs joué par les composants du SASP consiste à induire une réponse immunitaire efficace dirigée spécifiquement contre les cellules sénescents et permettant leur élimination. Cette réponse immunitaire induite par la sénescence implique aussi bien des cellules de l'immunité innée que des cellules de l'immunité adaptative.

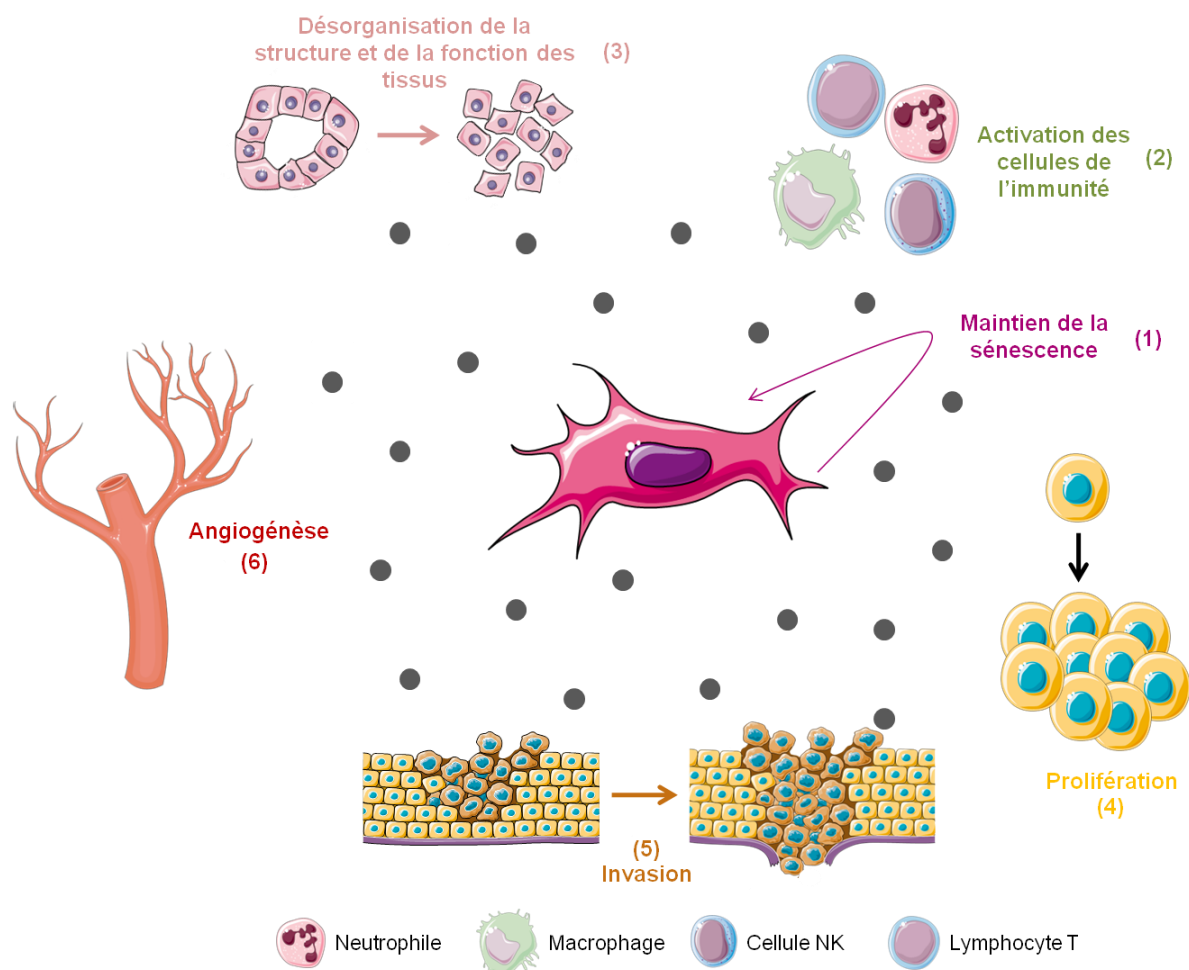


Figure 12 : les différents effets du SASP. La réponse des cellules au SASP dépend du contexte et du type cellulaire. Le SASP affecte les cellules sénescents elles-mêmes ainsi l'IL-6, l'IL-8 et l'IGFBP7 agissent de manière autocrine et renforce l'arrêt de prolifération et la sénescence des cellules (1). De plus, la sécrétion d'IL-1, de GM-CSF, de chimioattractants tels que MCP-1, MCP-2 et CXCL2 induit le recrutement et l'activation de cellules immunitaires à l'origine de l'élimination des cellules sénescents (2). Cependant, les composants du SASP affectent également les cellules voisines non immunitaires. Ainsi la libération de MMP-3 et MMP-10 induit la dégradation de la matrice extracellulaire et de fait la désorganisation de la structure et de la fonction du tissu normal (3). De plus, la libération de cytokines inflammatoire (IL-1 β , IL-6, IFN γ ...) favorise d'une part la prolifération des cellules préneoplasiques (4) et néoplasiques voisines et d'autre part la transition épithélio-mésenchymateuse, augmentant propriété invasive (5). Enfin, la sécrétion d'angiogénine et la libération de VEGF due à la dégradation de la matrice extracellulaire stimule l'angiogenèse et la formation de néovaisseaux (6).

4. L'utilisation de la sénescence en thérapie

Le rôle de la sénescence dans l'inhibition de la progression de lésions pré-malignes a favorisé l'idée que l'utilisation de traitements augmentant la sénescence pourrait être une alternative ou un complément aux thérapies anticancéreuses conventionnelles. Ainsi, des travaux ont montré que l'activation ou la stabilisation de la protéine p53 pourrait être utilisée pour forcer l'entrée en sénescence des cellules tumorales (Brown et al., 2009; Kortlever & Bernards, 2006) et sont à l'origine, avec d'autres, du développement de molécules restaurant l'activité de p53 (Efeyan et al., 2007; Kumamoto et al., 2008). D'autres études s'intéressent aux protéines impliquées dans le cycle cellulaire telles que p27 (Lin et al., 2010) ou Cdk2 (Senderowicz, 2003a; Senderowicz, 2003b). Enfin, des inhibiteurs des oncogènes tels que c-Myc (Gomez-Curet et al., 2006; Huang et al., 2006; Wang et al., 2007) ou des gènes suppresseurs de tumeurs tels que PTEN (Alimonti et al., 2010) sont également en cours d'évaluation. Plusieurs molécules actuellement en essais cliniques pourraient être utilisées comme thérapies pro-sénescences (Acosta & Gil, 2012).

L'utilisation de thérapies favorisant la sénescence des cellules tumorales permettrait d'attaquer les tumeurs sur deux fronts simultanément, d'une part en bloquant la prolifération des cellules tumorales et d'autre part en favorisant l'élimination des cellules sénescences par le recrutement du système immunitaire (figure 13).

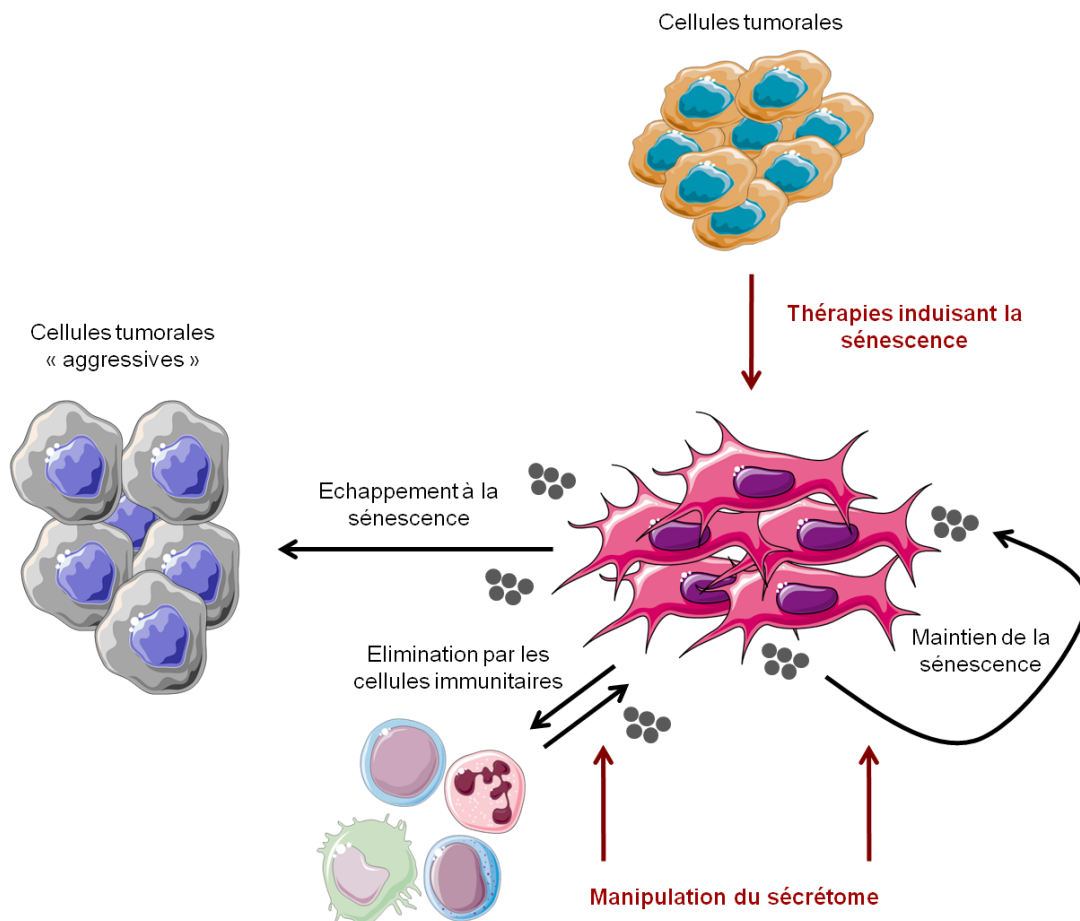


Figure 13 : la sénescence, une nouvelle arme dans le traitement des cancers. Les thérapies qui induisent la sénescence cellulaire arrêtent la progression des tumeurs par un mécanisme intrinsèque à la cellule (activation des voies p53/p21 et p16/pRb) ainsi que par l'induction d'un sécrétome spécifique (le SASP). Ce dernier permet de renforcer la sénescence des cellules tumorales et de favoriser leur élimination par les cellules immunitaires néanmoins il exerce également une action protumorigène sur les cellules voisines. Les futures thérapies pro-sénescence devront donc renforcer les effets bénéfiques du SASP (maintien de la sénescence et élimination par le système immunitaire) tout en limitant ses effets délétères.

On pourrait alors envisager d'activer par immunothérapie les cellules immunitaires recrutées au sein des tumeurs par les cellules sénescents afin d'augmenter la réponse immunitaire antitumorale, favorisant ainsi la régression des tumeurs et le développement d'une réponse immunitaire de type mémoire qui permettrait de prévenir les phénomènes de reprises des tumeurs.

V. Le système immunitaire

Le rôle du système immunitaire est de maintenir l'intégrité de l'organisme contre les agressions extérieures et les dysfonctionnements internes. En d'autres termes, les cellules de l'immunité reconnaissent et éliminent tout élément reconnu comme étranger et/ou dangereux. Cette définition inclue les bactéries, les virus, les parasites, mais aussi les cellules tumorales, les cellules sénescents et les cellules stressées.

1. Histoire de l'immunologie

L'immunologie est une fille de la microbiologie. En effet, les premières expériences de manipulation du système immunitaire ont été réalisées par Edward Jenner. Ce médecin anglais avait remarqué que les garçons de ferme qui avaient contracté la « maladie de la vache », la vaccine, n'étaient jamais atteints par la variole. Il décide alors d'inoculer un enfant de 8 ans, James Phipps, avec du pus prélevé sur une pustule de vaccine. Après six semaines, Jenner inocula la variole à l'enfant qui ne développa pas la maladie. La vaccination était née.

Les travaux de Jenner eurent une influence considérable sur le développement de l'immunologie, mais c'est à Louis Pasteur et Robert Koch que l'on doit les premiers éléments qui vont conduire à la compréhension des mécanismes biologiques de l'immunité. A la fin du 19^{ème} siècle, Robert Koch isole des bactéries présentes dans les ganglions lymphatiques de lapins morts de la tuberculose et démontre que ces organismes sont à l'origine de la maladie. Au même moment, Louis Pasteur étudie le choléra des poules et découvre par hasard que l'inoculation d'une forme atténuée du bacille du choléra des poules protège les animaux au lieu de les tuer. Les travaux de Koch et Pasteur furent à l'origine de « la théorie des germes » qui stipule qu'à la base de toute maladie il y a un microorganisme. Nous savons maintenant que toutes les maladies n'ont pas une origine infectieuse et donc que cette théorie est incomplète, néanmoins elle a permis de poser les grands principes de l'asepsie et d'expliquer l'origine de nombreuses infections.

Les années qui suivirent virent s'affronter deux conceptions opposées du mode de fonctionnement du système immunitaire, la théorie cellulaire de l'immunité développée par Elie Metchnikoff et la théorie humorale de l'immunité proposée par Paul Ehrlich.

Metchnikoff a l'intuition, à la suite d'observations de larves transparentes d'étoiles de mer, qu'il existe des cellules dont le rôle est de défendre l'organisme contre des agents étrangers. Il réalise alors des expériences dans lesquelles il met en évidence le phénomène de phagocytose qu'il propose comme étant la première ligne de défense de l'organisme contre les infections. Paul Ehrlich s'appuie sur les travaux de Von Behring et de Kitasato et propose que l'immunité est portée par une réaction de type « antigène-anticorps ». Von Behring et Kitasato ont montré que l'immunité contre la diphtérie est portée par un médiateur soluble dans le sang, une « anti-toxine ». Ehrlich suggère que les antigènes interagissent avec des récepteurs portés par des cellules spécialisées du système immunitaire, conduisant alors à une sécrétion importante de ces récepteurs, les anticorps.

Paul Ehrlich et Elie Metchnikoff partagèrent le prix Nobel de médecine en 1908 « en reconnaissance de leurs travaux sur l'immunité ».

De nombreux travaux ont depuis établi que ces deux conceptions de l'immunité, loin de s'opposer, se complètent. En effet, le fonctionnement du système immunitaire repose sur l'interaction entre l'immunité innée, dont la phagocytose est une composante essentielle, et l'immunité adaptative, basée sur des réactions de type antigène / anticorps.

2. Les mécanismes d'activation du système immunitaire

L'immunité innée est commune à tous les organismes pluricellulaires et constitue la deuxième ligne de défense de l'organisme (les épithéliums étant la première ligne de défense de par leur rôle de barrière physique). Elle permet une reconnaissance rapide et non spécifique de motifs moléculaires normalement absents de l'organisme. Cette reconnaissance induit une réponse inflammatoire rapide non spécifique visant à éliminer le motif étranger. Dans le même temps, l'inflammation induit un recrutement important d'autres cellules de l'immunité innée qui vont participer à l'élimination du motif étranger et à l'activation des cellules de l'immunité adaptative. En effet, des cellules de l'immunité innée appelées « cellules présentatrices de l'antigène » (Antigen Presentating Cells, APC) vont phagocyter le motif étranger, l'apprêter et migrer dans les organes lymphoïdes secondaires que sont les ganglions lymphatiques et la rate pour présenter l'antigène aux cellules de l'immunité adaptative, les

lymphocytes B et T (Steinman & Witmer, 1978). Ces cellules vont alors être activées et une réponse immunitaire spécifique va se développer.

a) Ehrlich et la théorie de la reconnaissance du « non-soi »

Ehrlich a été le premier à proposer le concept selon lequel le système immunitaire puisse discriminer le *soi* du *non-soi*, une propriété qui permet aux cellules immunitaires de réagir contre les organismes étrangers sans pour autant s'attaquer aux cellules de l'organisme. La compréhension des mécanismes régissant ce phénomène a occupé le monde de l'immunologie durant de nombreuses décennies (Bretscher & Cohn, 1970). Dans les années 1950, Lederberg, Burnet et Medawar ont montré que lors de la maturation des lymphocytes, les clones autoréactifs (c'est-à-dire réagissant contre des antigènes normalement exprimés dans l'organisme) sont éliminés (Lederberg, 2002). Plus tard, Jenkins et Schwartz démontrèrent que la fixation de l'antigène sur le récepteur des lymphocytes ne permet pas une activation complète de la cellule, un second signal étant nécessaire (Jenkins et al., 1987).

b) Janeway et la « théorie du non-soi infectieux »

Au début des années 1990, Charles Janeway proposa que le signal de costimulation nécessaire à l'activation des lymphocytes soit porté par les APC et induit par des composés bactériens conservés au cours de l'évolution appelés PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern), tels que les lipopolysaccharides (LPS) qui sont des constituants des parois des bactéries Gram négatifs (Janeway, 1989a; Janeway, 1989b; Janeway, 1989c). Les propriétés immunostimulatrices de certaines structures bactériennes étaient connues mais on en ignorait les raisons. Janeway émit l'hypothèse que la reconnaissance de ces structures était réalisée par des récepteurs portés par les cellules de l'immunité innée, les PRR (Pattern Recognition Receptors).

En 1997, Janeway et Medzhitov identifièrent la protéine TLR4 (Toll Like Receptor) qui est une protéine humaine homologue de la protéine transmembranaire Toll découverte chez la *Drosophile* (Medzhitov, Preston-Hurlburt & Janeway, 1997). TLR4 est exprimé à la surface des cellules de l'immunité innée où il est activé par la fixation de molécule de LPS, induisant une cascade de signalisation intracellulaire. Les cellules immunitaires vont alors engager des

mécanismes de défense antibactérienne et exprimer à leur membrane les molécules de costimulation qui vont permettre l'activation efficace des lymphocytes et le développement d'une réponse immunitaire adaptative.

De nombreux types de PRR et leurs PAMPs correspondants ont depuis été identifiés. En 1989, Janeway proposa une alternative à la théorie de la reconnaissance du *soi / non-soi* par le système immunitaire, il suggère que les cellules de l'immunité sont capables de reconnaître le *non-soi* infectieux (figure 14) (Janeway, 1989b).

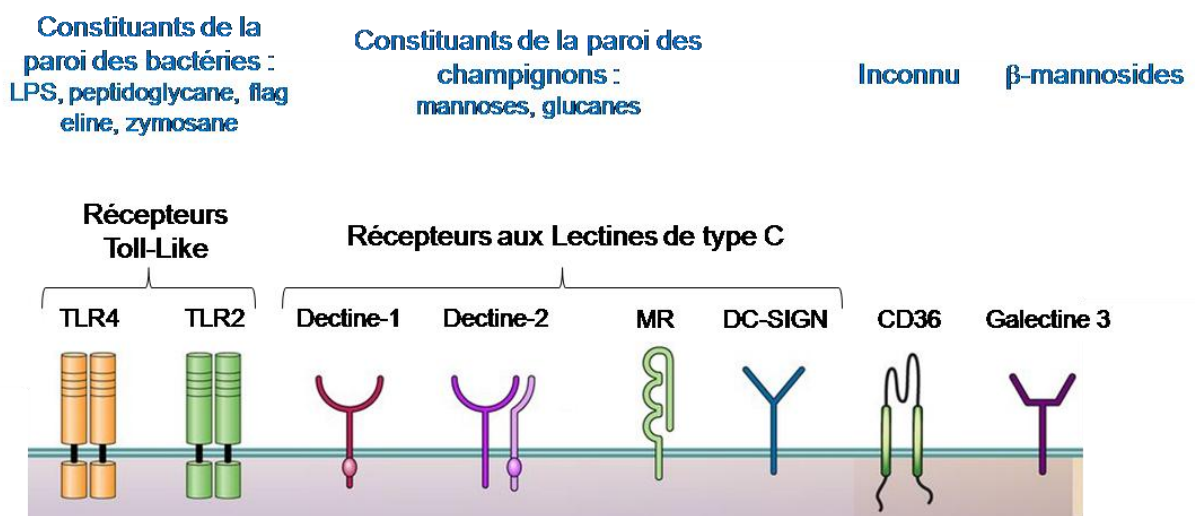


Figure 14 : quelques exemples de PRR et leurs principaux ligands. Les deux familles de PPR les plus importantes et les plus étudiées sont les récepteurs Toll-like (TLR) et les récepteurs aux Lectines de type C. Ils sont majoritairement présents à la surface des cellules et leur liaison à leurs ligands respectifs induit l'activation de voies de signalisation intracellulaire à l'origine notamment de la production de cytokines et de chimiokines.

c) Matzinger et « la théorie du danger »

Cependant, cette théorie atteint ses limites lorsque le système immunitaire est activé en absence de pathogène. Pour résoudre cette contradiction, en 1994 Polly Matzinger propose que l'origine de l'antigène qui active le système immunitaire n'a pas d'importance. Pour elle, la réponse immunitaire peut être induite par des signaux « danger » appelés DAMP's (Damage Associated Molecular Pattern) par analogie avec les PAMP's de Janeway. Ces signaux seraient libérés par les tissus lésés aussi bien par un pathogène que par un traumatisme et pourraient se fixer sur les PRR (Matzinger, 1994). De nombreuses preuves

expérimentales sont depuis venues étayer cette théorie, notamment la découverte de récepteurs capables d'être activés par des formes de mort cellulaire immunogène (Medzhitov, 2009).

Les modèles proposés par Janeway et Matzinger coexistent depuis bientôt 20 ans et rendent compte de mécanismes alternatifs d'activation du système immunitaire. Néanmoins, si ces deux théories sont en désaccord sur l'origine du signal initiateur, elles s'accordent sur le rôle central joué par les cellules de l'immunité innée dans l'induction d'une réponse immunitaire adaptative efficace.

L'activation efficace des cellules de l'immunité innée est un des axes de recherche dans le développement de traitement des cancers par immunothérapie.

VI. L'immunothérapie

1. Histoire de l'immunothérapie

L'immunothérapie est construite sur l'idée que le système immunitaire du patient peut être stimulé afin qu'il reconnaisse et détruise les cellules tumorales (Lesterhuis, Haanen & Punt, 2011). En effet, depuis plusieurs siècles des régressions spontanées de tumeurs concomitantes à de fortes infections ont été observées. Au début du 18^{ème} siècle Deidier remarqua que la scarification de tumeurs avec du pus provenant de furoncle induisait une régression des tumeurs (Jeannin, 2010). Puis à la fin du 19^{ème} siècle deux médecins allemand, W. Busch et F. Fehleisen constatèrent que certaines tumeurs régressaient chez les patients atteints d'une infection à *Streptococcus pyogenes* appelée érysipèle (Linnebacher et al., 2012).

Au même moment, de l'autre côté de l'Atlantique, William Coley, un jeune médecin de New-York, observe également que des tumeurs malignes, en particulier des sarcomes, régressent chez les patients souffrant d'infections bactériennes. En 1891, il décide alors de traiter des malades en injectant dans les tumeurs l'agent responsable de l'érysipèle. Les patients traités présentent tous les symptômes classiques d'une infection, à savoir de la fièvre, des tremblements et des malaises. Cependant, de nombreux patient meurent des suites d'une

infection systémique, Coley décide alors d'utiliser un mélange de deux souches bactériennes préalablement inactivées par la chaleur, *Streptococcus pyogenes* et *Serratia marcescens*. Ce mélange sera par la suite désigné sous le terme de « toxine de Coley » (McCarthy, 2006; Wiemann & Starnes, 1994; Zacharski & Sukhatme, 2005).

Entre 1891 et sa mort en 1936, Coley traita des centaines de malades mais des doutes émis sur la validité des cancers diagnostiqués et le développement de nouvelles techniques, la radiothérapie et la chimiothérapie, reléguèrent l'immunothérapie au rang des traitements non conventionnels. Les progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes d'activation du système immunitaire innée par des produits bactériens ont apporté une justification scientifique solide aux travaux de Coley et ont rendu à l'immunothérapie sa place aux côtés des autres thérapies anticancéreuses.

Ainsi, l'immunothérapie intra-vésicale par instillations de bacilles de Calmette-Guérin (BCG) a révolutionné le traitement des tumeurs superficielles de la vessie et présente un taux de réponses (disparition totale du carcinome *in situ*) pouvant atteindre 80 % (Brosman, 1985; Catalona et al., 1987).

2. La découverte de la molécule active du mélange de Coley, le lipide A

L'analyse des composés bactériens présents dans le mélange de Coley par Shear en 1943 a mis en évidence la présence de molécule de LPS (Shear & Turner, 1943). La caractérisation de la structure des lipopolysaccharides permet d'identifier trois domaines structuraux différents. Le polysaccharide O est constitué de séquences oligosaccharidiques répétées, il porte l'activité antigénique de la molécule de LPS permettant le sérotypage des bactéries (Hase & Rietschel, 1976). La partie centrale de la molécule, aussi appelée « core », est une structure polysaccharidique reliant la chaîne O au troisième domaine des LPS, le lipide A.

Le lipide A est un glycophospholipide composé de deux molécules de glucosamines auxquelles sont rattachées des groupements phosphates et de longues chaînes d'acides gras spécifiques de l'espèce bactérienne. Le lipide A a pour fonction d'ancrer la molécule de LPS dans la membrane externe des bactéries Gram négatif (figure 15) (Gmeiner, Lüderitz & Westphal, 1969).

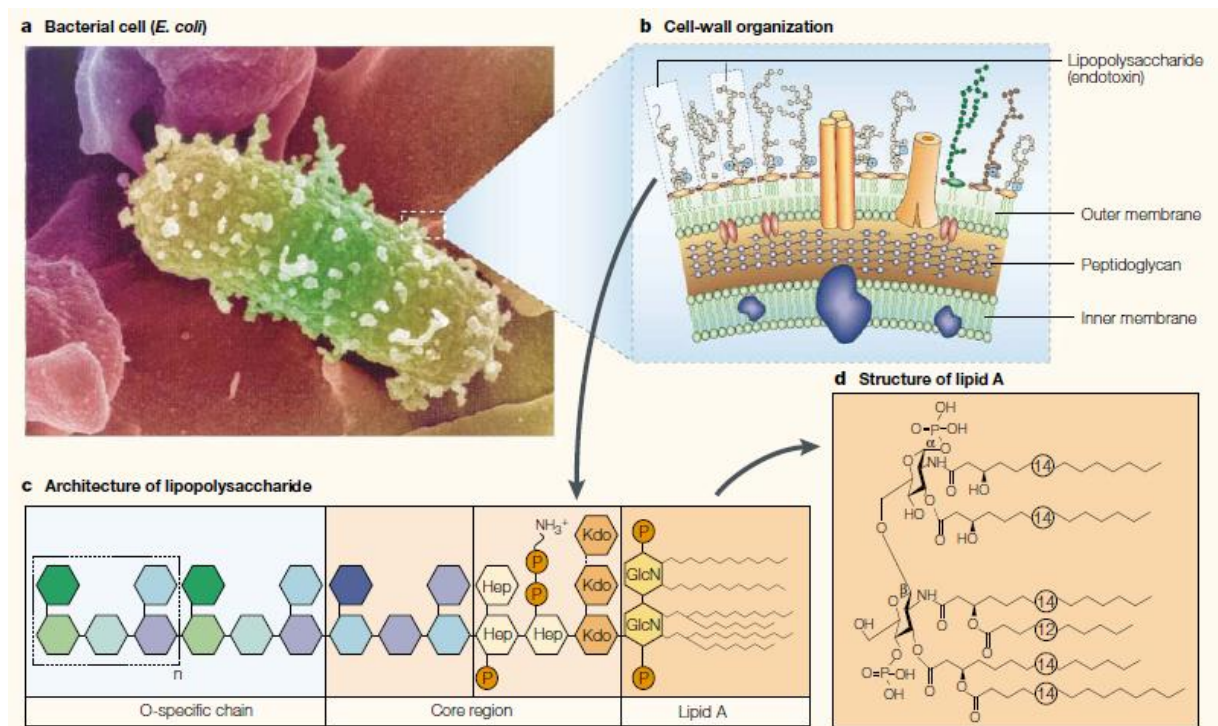


Figure 15 : origine et structure des lipopolysaccharides (LPS) (d'après Beutler et Rietschel, 2003). Micrographie électronique d'une bactérie *Escherichia coli* (a) avec une représentation schématique de sa paroi (b), de l'architecture générale des molécules de LPS (c) et d'un lipide A (d). (GlcN : D-glucosamine, Hep : L-glycero-D-manno-heptose, Kdo : acide 2-keto-3-désoxy-octulosonic, P : phosphate).

Les lipides A sont la partie active des endotoxines bactériennes et sont responsables de la quasi-totalité des effets physiopathologiques des molécules de LPS (Beutler & Rietschel, 2003).

De nombreuses études ont été menées pour déterminer l'effet du lipide A sur la régression tumorale et les mécanismes sous jacents. En 1989 Tobias a montré une augmentation significative de l'activité des lipides A après liaison aux LPS Binding Protein (LBP), des glycoprotéines sériques formant des complexes de hautes affinités avec les lipides A (Schumann et al., 1990; Tobias, Soldau & Ulevitch, 1989). Les lipides A sont des ligands de plusieurs récepteurs membranaires identifiés à la surface de nombreuses cellules immunitaires telles que les macrophages où les polynucléaires neutrophiles mais également par les cellules endothéliales (Dunzendorfer et al., 2004; Rasool, Nnalue & Jarstrand, 1992). Ainsi, les intégrines CD11/CD18 qui sont des complexes hétérodimériques transmembranaires

présentent à la surface des leucocytes, une fois activée par la fixation d'un lipide A, induisent une cascade de signalisation dont la conséquence est la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B (Flaherty et al., 1997).

Cependant le principal récepteur connus des lipides A est la protéine TLR4, associée aux corécepteurs CD14 et MD-2.

Les lipides A sont fixés par les protéines CD14 qui sont ancrées dans les membranes plasmiques des cellules myéloïdes matures par une molécule de glycosylphosphatidylinositol (Wright et al., 1990), l'affinité de cette liaison est étant augmentée lorsque le lipide A est lié à une molécule de LBP. Une fois capté, le lipide A induit la translocation nucléaire de NF- κ B et la libération du facteur de transcription c-Rel qui va permettre l'expression et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF α , l'IFN γ ou l'IL-1 β (Libermann & Baltimore, 1990). L'activation de la voie NF- κ B par les lipides A induit également l'expression d'enzymes impliquées dans la réponse immunitaire telle que la NO-synthase inductible (iNOS) (Takai et al., 1997). Des études utilisant d'une part des souris invalidées pour l'expression du gène de la molécule CD14 (Moore et al., 2000), d'autre part des anticorps antagonistes de CD14 (Ingalls et al., 1999a; Ingalls, Monks & Golenbock, 1999b), ont confirmé l'implication de cette protéine dans la réponse aux lipides A. Cependant, la protéine CD14 ne possède pas de domaine transmembranaire permettant le transfert du signal d'activation vers le compartiment interne de la cellule, elle doit donc s'associer à une molécule transmembranaire, TLR4.

3. Le principal récepteur des lipides A, TLR4

TLR4 appartient à la famille des récepteurs Toll, initialement décrit chez *Drosophila melanogaster* comme étant impliqués dans l'embryogénèse (Nüsslein-Volhard, 1996). Cependant, en 1996 Jules Hoffmann démontre l'implication de Toll dans l'immunité antifongique chez la Drosophile (Lemaitre et al., 1996). En 1997, Janeway identifie un paralogue humain, TLR4 et suggère son implication dans l'activation de l'immunité adaptative, hypothèse qui sera confirmée en 1998 par Bruce Beutler qui démontre que TLR4 est le récepteur des LPS bactériens (Beutler & Rietschel, 2003). Actuellement 10 TLR ont été identifiés chez l'Homme et si leurs ligands respectifs ne sont pas encore tous connus, plusieurs ligands de TLR4 ont déjà été identifiés. Ainsi les lipides A mais également le taxol,

certaines Heat Shock Protein (HSP) dont HSP60 et HSP70 et le hyaluronane ont été décrits comme pouvant induire une réponse cellulaire via leur fixation à TLR4 (Habich et al., 2002; Kawasaki et al., 2000; Ohashi et al., 2000; Taylor et al., 2004).

TLR4 est une glycoprotéine membranaire caractérisée par un domaine extracellulaire composé de motifs répétés riches en leucine, relié par une chaîne transmembranaire à un domaine intracellulaire portant le domaine d'activation du récepteur, le domaine TIR (Toll IL-1 receptor). La molécule de lipide A est d'abord fixée par la molécule MD-2 avant d'être transférée sur le récepteur TLR4 (Akashi et al., 2001). Une fois que le complexe lipide A / MD-2 / TLR4 est formé, il y a activation du récepteur TLR4 par dimérisation et recrutement de plusieurs protéines cytoplasmiques dites « protéines adaptatrices » telles que MyD88 (Myeloid Differentiation primary response protein 88), TIRAP (TIR domain containing adaptor protein), TRIF (TIR domain containing adaptor protein inducing IFN β), TRAM (TRIF related adaptor molecule) et des kinases telles que les protéines de la famille IRAK (Interleukin-1 receptor associated kinase) (O'Neill & Bowie, 2007).

4. Les signalisations associées à l'activation de TLR4 par la fixation de lipide A

Deux voies de signalisation intracellulaire peuvent être induites par la fixation de lipide A sur TLR4, une voie MyD88 dépendante et une voie indépendante de MyD88. Dans la première MyD88 recrute les protéines IRAK 1/4 et TRAF6 (TNFR Associated Factor 6) qui vont permettre l'activation de la voie des MAP kinase (p38, JNK 1/2 et ERK 1/2) et la translocation nucléaire de NF- κ B (Akira, Takeda & Kaisho, 2001; Guha et al., 2000). La voie MyD88 indépendante induit le recrutement sur le domaine TIR de TLR4 des protéines TRAM et TRIF, elle conduit à l'activation de la protéine IRF3 et à la production d'IFN- β . Elle permet également l'activation des voies NF- κ B et MAPK bien que de manière plus tardive (figure 16) (Takeda, 2005; Takeda & Akira, 2005).

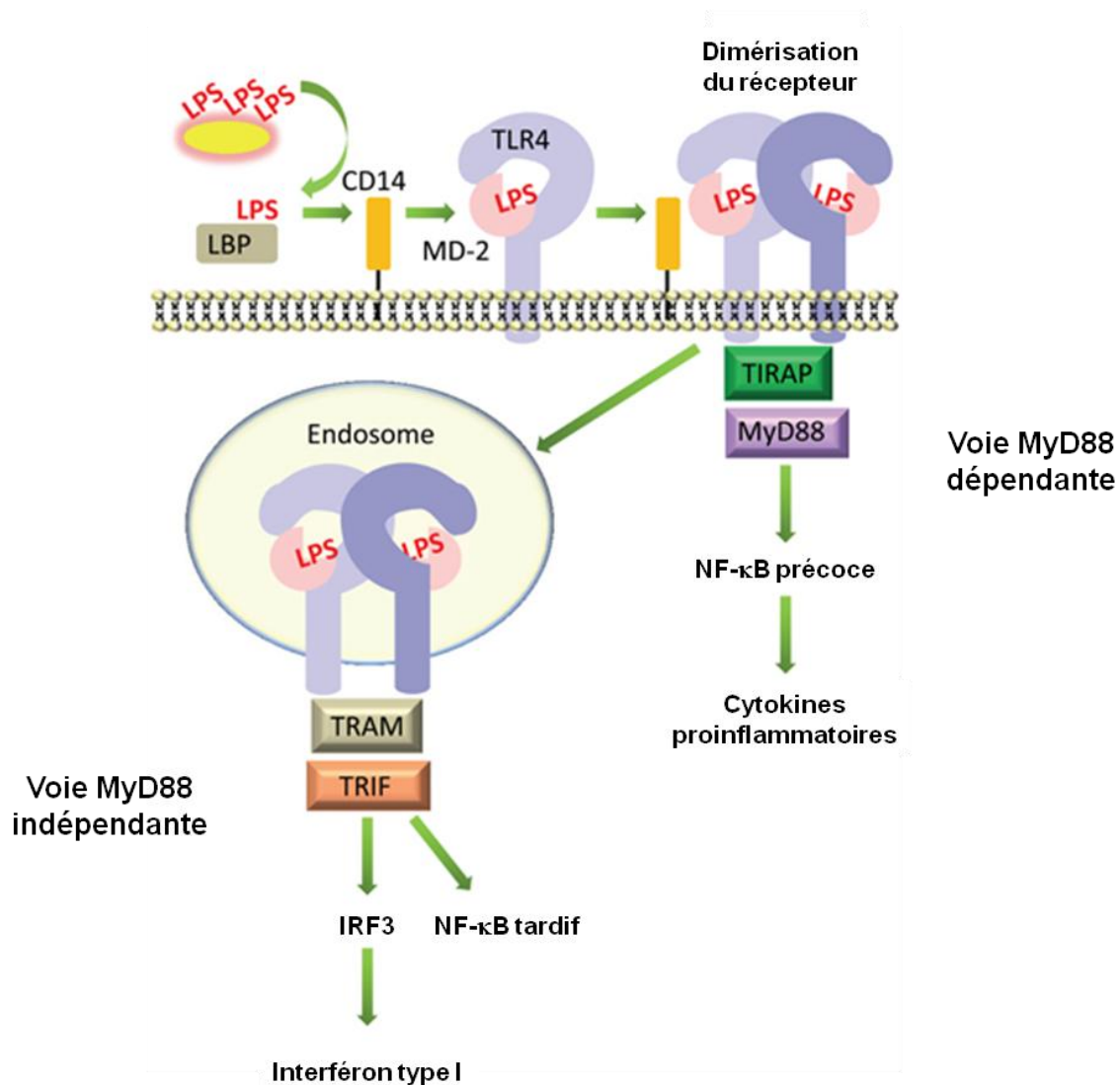


Figure 16 : voies de signalisation de TLR4 MyD88-dépendante et MyD88-indépendante (d'après Maeshima et al 2013). Dans le sérum les molécules de LPS sont fixées par les protéines LBP (LPS Binding Protein) qui permet leur fixation sur le corécepteur CD14. Ce dernier va ensuite transférer la molécule de LPS sur le complexe MD-2 / TLR4. La fixation de la molécule de LPS sur le récepteur TLR4 induit sa dimérisation et le recrutement des protéines adaptatrices TIRAP et MyD88 et ensuite l'activation du facteur de transcription NF-κB. Le complexe MD-2 / TLR4 peut également être internalisé dans des endosomes, il y a alors recrutement des protéines adaptatrices TRIF et TRAM, activation du facteur de transcription IRF3 et production d'interféron de type I. Dans ce cas une activation tardive de NF-κB est observée.

Quelle que soit la voie de signalisation activée, la fixation de lipide A sur les récepteurs TLR4 des cellules immunitaires et endothéliales induit l'expression de molécules proinflammatoires telles que le $\text{TNF}\alpha$, l' $\text{IFN}\gamma$, l' $\text{IL-1}\beta$, l' IL-6 , l' IL-8 et le PAF1 (Platelet

Activating Factor 1), la production de médiateur de l'inflammation (prostaglandines et leukotriènes), l'activation de la cascade du complément et la production d'espèces réactives de l'oxygène telles que des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). De plus, l'expression de l'iNOS et la production de monoxyde d'azote (NO) sont également induites dans des monocytes traités par un lipide A (Aybay & Imir, 1998; López-Urrutia et al., 2000; Saha et al., 1997; Tanamoto et al., 1997).

5. L'activation de l'immunité par les lipides A

Les lipides A sont donc de puissants activateurs du système immunitaire inné et cette propriété les rend particulièrement intéressants en immunothérapie anticancéreuse. De fait, les travaux de Coley ont démontré l'intérêt de l'utilisation de produits bactériens dans le but d'induire une réponse immunitaire antitumorale. Plus récemment, l'utilisation de lipide A chez la souris a permis d'augmenter l'activité cytotoxique de cellules NK vis-à-vis de cellules tumorales. De plus, un analogue de lipide A, le MPL (MonoPhosphoryl Lipid A) permet d'induire la maturation des cellules dendritiques qui vont alors sécréter de l'IL-12 et exprimer à leur membrane les molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86, permettant ainsi une meilleure activation des lymphocytes et le développement d'une réponse immunitaire adaptative (Ismaili et al., 2002).

Plusieurs essais cliniques de phase I utilisant des lipides A obtenus à partir des souches bactériennes *Salmonella typhimurium* et *Salmonella minnesota* ou synthétiques (SDZ MRL 953 et ONO-4007) ont été entrepris (de Bono et al., 2000; Kiani et al., 1997; Vosika, Barr & Gilbertson, 1984). Dans tout les cas, les lipides A ont été bien tolérés, les patients ont développé les symptômes classiques d'une infection, à savoir de la fièvre et des frissons mais aucune toxicité rénale ou hépatique n'a été mise en évidence. L'augmentation des concentrations sériques de différentes cytokines (G-CSF, IL-6, $TNF\alpha$) ainsi que du nombre de granulocytes circulant ont été observés, cependant aucune activité antitumorale n'a été détectée chez les patients.

6. Un lipide A synthétique, l'OM-174

Dans le laboratoire, nous avons utilisé un analogue de lipide A produit par les laboratoires OM Pharma (Meyrin, Suisse), appelé OM-174, obtenu à partir d'une souche mutante de la bactérie *Escherichia coli*, et complètement caractérisé chimiquement. Ce lipide A est une diglucosamine portant trois chaînes d'acides gras (deux acides hydroxymyristiques liées aux résidus amines et un acide laurique) et deux groupements phosphates (figure 17).

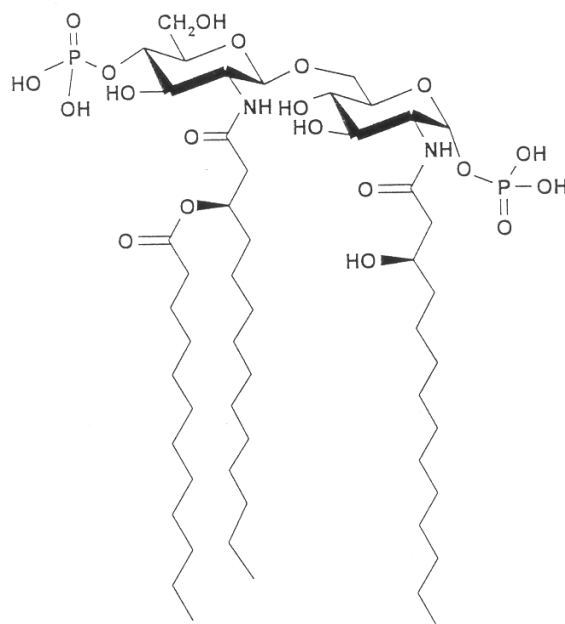


Figure 17 : structure de l'OM-174 (OM Pharma). L'OM-174 est un analogue de lipide A obtenu à partir d'une souche mutante de bactérie *Escherichia coli*. Cet analogue est chimiquement caractérisé et a pour formule chimique : 2-désoxy-6-O-[2-désoxy-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-O-phospho-b-D-glucopyranosyl]-2-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-a-D-glucopyranosyl dihydrogènéphosphate.

Ce lipide A a montré une efficacité antitumorale importante dans différents modèles animaux expérimentaux utilisés dans notre laboratoire. En effet, dans un modèle de cancer colique chez le rat, l'injection intraveineuse répétée de lipide A guérit 95% des rats. L'action du lipide A est corrélée à l'expression de l'iNOS et à la production de NO au sein des tumeurs, ainsi qu'à la production de cytokines de l'inflammation (IL-1 β , TNF α et IFN γ) et à l'inhibition de TGF β 1 dans les tumeurs. De plus, l'effet antitumoral du lipide A est lié à la mort par apoptose d'une partie des cellules tumorales ainsi qu'au développement d'une réponse immunitaire (Lagadec et al., 1999; Onier et al., 1999a; Onier et al., 1999b). En effet,

nous avons montré que ce lipide A induit le recrutement au sein des tumeurs de nombreuses cellules immunitaires et notamment des macrophages et des neutrophiles (Martin et al, soumis).

Dans un modèle de métastases pulmonaires induites chez la souris Balb/C par injection intraveineuse de cellules syngéniques de cancer mammaire EMT-6H, le lipide A augmente la survie des animaux et diminue le nombre et le volume des nodules pulmonaires. Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que le lipide A induit la sécrétion d'IFN γ par les cellules de la souris et que l'effet du lipide A via les récepteurs TLR4 combiné à l'IFN γ induit l'expression de l'iNOS par les cellules tumorales. L'iNOS va produire du monoxyde d'azote (NO) ainsi que des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) par découplage. La réaction de conjugaison de ces deux espèces radicalaires (NO et ROS) induit la formation de peroxynitrites cytotoxiques pour les cellules tumorales (Lamrani et al, soumis).

Les résultats de ces études précliniques ont permis la conduite de deux essais cliniques de phase I/II dans le but d'établir la pharmacocinétique et la toxicité de ce lipide A chez les patients. Le premier essai consistait en une injection unique de lipide A à des doses croissantes (600, 800, 1000 et 1600 $\mu\text{g}/\text{m}^2$) alors que dans le second les malades recevaient un nombre croissant d'injection du produit à une dose fixe (la plus forte dose testée étant 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$). Les patients développèrent principalement de la fièvre, des frissons, des nausées, mais aucun effet secondaire hématologique ne fut observé, la dose maximale tolérée ne put donc pas être déterminée. Une augmentation progressive du nombre et de l'activité des cellules NK a été mise en évidence. De plus, la production de TNF α et d'IL-6 a été détectée après la première injection de lipide A et a diminué progressivement durant le traitement, montrant le développement d'une tolérance des macrophages au lipide A. Enfin, trois patients présentèrent une stabilisation de leur maladie durant en moyenne 4 mois (Isambert et al., 2013).

Ce lipide A induit une réponse immunitaire antitumorale notamment via le recrutement et l'activation de cellules immunitaires innées. Nos travaux nous ont amenés à nous intéresser au rôle joué par les neutrophiles dans la régression tumorale induite par le lipide A.

VII. Les neutrophiles

Les granulocytes neutrophiles sont les cellules blanches du sang les plus abondantes chez l'Homme où elles représentent entre 50 et 70% des cellules nucléées. Décrit par Paul Ehrlich en 1900, ce sont de petites cellules polylobées d'environ 10 µm de diamètre et présentant de nombreuses granulations cytoplasmiques.

Les neutrophiles étaient autrefois considérés comme de simples cellules phagocytaires à la durée de vie très courte et dont la fonction était de défendre l'organisme contre n'importe quelle agression par un élément exogène (bactérien, viral, parasitaire). Cependant, des études de plus en plus nombreuses révèlent aujourd'hui leur importante plasticité et leur implication dans de multiples processus inflammatoires. Ces découvertes récentes suscitent un intérêt renouvelé pour ces cellules dont de nombreuses caractéristiques nous échappent encore.

1. Les neutrophiles et l'immunité anti-infectieuse

a) Recrutement des neutrophiles au site infectieux

Chaque jour, la granulopoïèse se déroulant dans la moelle osseuse génère chez un être humain adulte entre 1 à $2 \cdot 10^{11}$ neutrophiles. Les neutrophiles immatures sont alors retenus dans la moelle osseuse par la fixation sur leur récepteur CXCR4 de la chimiokine CXCL12 produite par les cellules stromales de la moelle osseuse. Une fois la différenciation terminée, différents récepteurs sont exprimés à la membrane des neutrophiles, notamment CXCR2, et c'est la fixation sur ces récepteurs de leurs ligands (CXCL1, 2, 3 et 5) qui induit la libération des neutrophiles dans la circulation sanguine (Borregaard, 2010; Kolaczowska & Kubes, 2013).

Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires recrutées aux sites inflammatoires où ils migrent rapidement par chimiotactisme. La réponse inflammatoire développée par les neutrophiles contre les agents pathogènes est un processus séquentiel. La première étape est l'adhésion des neutrophiles circulants à la paroi de l'endothélium vasculaire où sont présentés les chimioattractants des neutrophiles (CXCL2, CXCL5,...). L'activation des cellules endothéliales par des médiateurs inflammatoires, tels que les

histamines et les cytokines inflammatoires qui sont libérés en cas d'infection, induit l'augmentation de l'expression membranaire des intégrines P-sélectine et E-sélectine (Ley et al., 2007; Petri, Phillipson & Kubes, 2008). La reconnaissance des intégrines à la surface des cellules endothéliales par les neutrophiles induit un changement de conformation des molécules LFA1, MAC1, ICAM1 et ICAM2 et permet l'adhésion des neutrophiles à la paroi des vaisseaux. Des modifications de la localisation et de l'expression de nombreuses molécules d'adhésion tant à la surface des cellules endothéliales que des neutrophiles permettent l'extravasation des cellules immunitaires. Ce phénomène est favorisé par la libération de protéases (MMP-9 et neutrophiles élastase) par les neutrophiles, ce qui permet de libérer les cellules endothéliales de la matrice extracellulaire. De plus, la dégradation partielle de la matrice extracellulaire favorise la migration des neutrophiles vers le site de l'infection (figure 18) (Kolaczowska & Kubes, 2013).

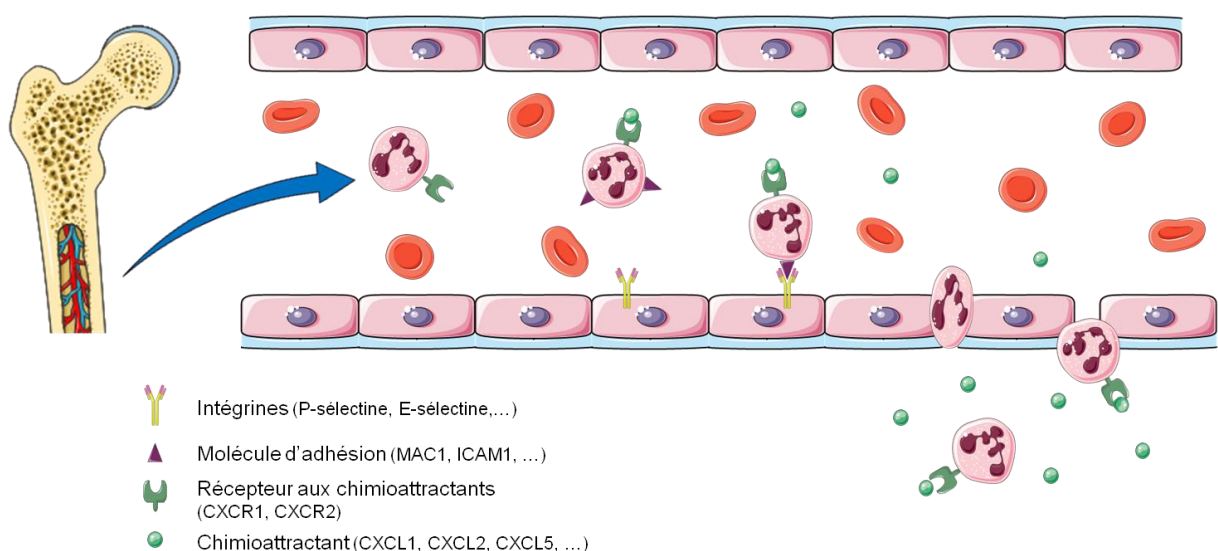


Figure 18 : recrutement et extravasation des neutrophiles au site de l'infection. Une fois leur maturation dans la moelle osseuse terminée, les neutrophiles sont libérés dans la circulation sanguine et migrent en direction des sites inflammatoires suivant un gradient chimiotactique induit par la fixation des chimioattractants (CXCL1, CXCL2, CXCL5, ...) sur les récepteurs CXC1 et CXC2. Au niveau du site inflammatoire, les cellules endothéliales sont activées par des médiateurs inflammatoires et expriment à leur membrane des intégrines (E-sélectine, P-sélectine,...) dont la reconnaissance par les molécules d'adhésions exprimées à la membrane des neutrophiles (ICAM1, MAC1, ...) permet la fixation et l'extravasation des polynucléaires en direction du site inflammatoire.

Les neutrophiles constituent la première ligne de défense cellulaire contre des pathogènes et jouent un rôle important dans le développement d'une réponse immunitaire efficace. En effet, diverses données expérimentales et cliniques ont montré qu'une diminution sévère du nombre de neutrophiles sanguins était responsable d'une immunodéficience sévère de l'individu (Kolaczowska & Kubes, 2013).

b) Elimination des pathogènes par les neutrophiles

Les neutrophiles phagocytent les organismes pathogènes et les tuent en produisant des espèces réactives de l'oxygène (superoxyde, peroxyde d'hydrogène et acide hypochloreux), des composés antimicrobiens ainsi qu'en fusionnant au phagosome des granules contenant des protéines protéolytiques (Segal, 2005; Theilgaard-Mönch, Porse & Borregaard, 2006). On observe également la libération dans le milieu extracellulaire de molécules stockées dans différents types de granules, telles que des protéines de remodelage de la matrice extracellulaire (uPA,...), des cytokines inflammatoires (IL-1 β , TNF α ,...) ainsi que des chimiokines (MCP-1, MIP-1 α , MIP-2 α , MIP-3 α , Oncostatine M,...). Ces molécules vont permettre la régulation de la réponse inflammatoire en induisant le recrutement d'autres cellules immunitaires effectrices dont les macrophages, les lymphocytes T et les neutrophiles eux-mêmes (figure 19) (Kobayashi et al., 2003a; Kobayashi, Voyich & DeLeo, 2003b; Theilgaard-Mönch et al., 2006).

Enfin, les neutrophiles activés vont entrer en apoptose, ce qui va faciliter la résolution de l'inflammation et prévenir les dommages tissulaires causés par la lyse des cellules nécrotiques, la libération de protéines effectrices cytotoxiques et d'espèces réactives de l'oxygène dans le milieu extracellulaire (Theilgaard-Mönch et al., 2006).

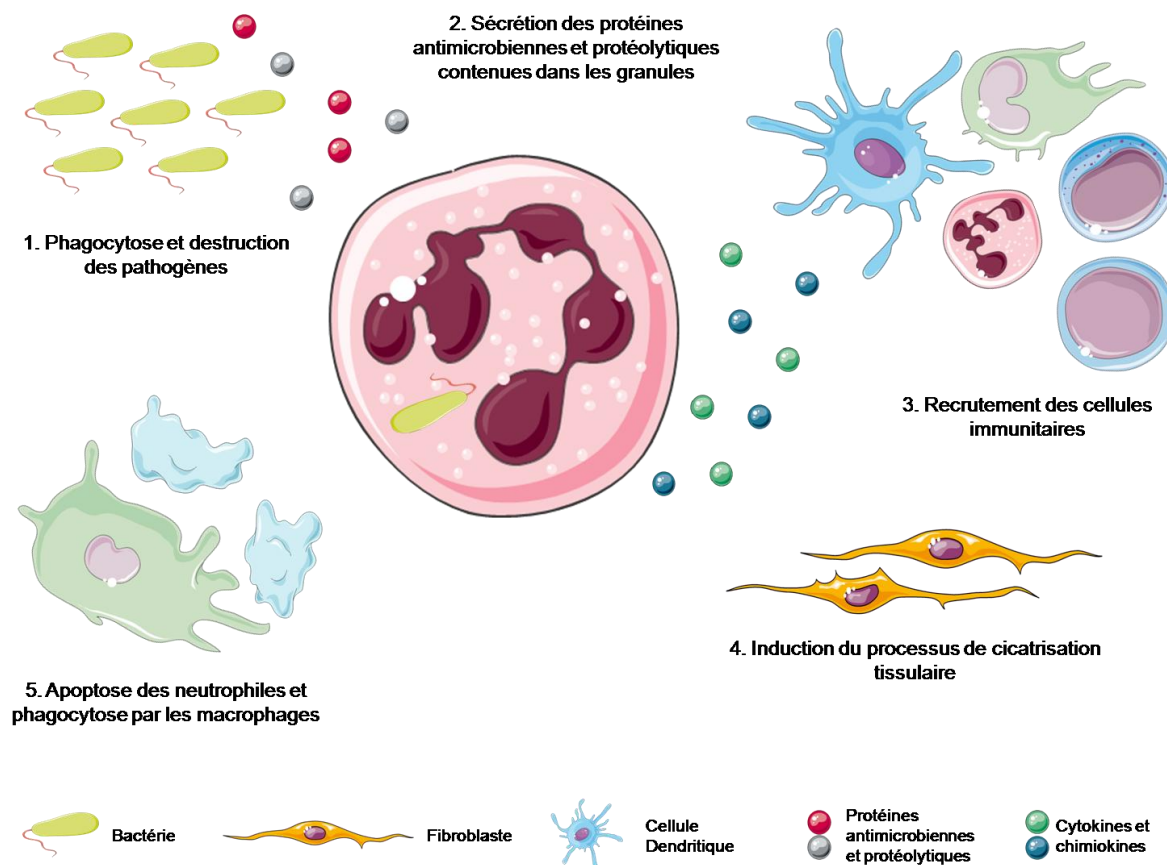


Figure 19 : mécanisme anti-infectieux des neutrophiles. Une fois recrutés au site de l'infection, les neutrophiles sont activés et élimine les pathogènes en les phagocytant et en libérant des molécules antimicrobiennes et protéolytiques (neutrophile élastase, cathepsine G, myéloperoxydase, ...) ainsi qu'en produisant des espèces réactives de l'oxygène (superoxyde, peroxyde d'hydrogène et acide hypochloreux). Les neutrophiles vont également synthétiser et sécréter des cytokines inflammatoires (IL-1 β , TNF α , ...) et des chimioattractants (MCP-1, MIP-1 α , Oncostatine M, ...) qui vont permettre le recrutement et l'activation des autres cellules immunitaires. De plus, la libération de protéines de remodelage de la matrice extracellulaire (uPA, MMP-3, ...) active le processus de réparation tissulaire. Enfin, les neutrophiles activés vont entrer en apoptose et seront phagocytés par les macrophages, permettant ainsi la résolution du processus inflammatoire et prévenant les dommages tissulaires.

En 2004, une nouvelle stratégie déployée par les neutrophiles a été identifiée : la formation de NETs (Neutrophil Extracellular Traps). Il s'agit d'un réseau de fibres extracellulaires constituées de protéines antimicrobiennes contenues dans les granules (neutrophile élastase, cathepsine G et myéloperoxydase), d'histones et de molécules d'ADN (Brinkmann et al., 2010; Brinkmann et al., 2004; Ermert et al., 2009). Ces fibres extracellulaires ont la capacité de lier les pathogènes et d'induire leur mort soit directement

via l'action des protéases, soit après phagocytose par les neutrophiles (figure 20). Le mécanisme de formation de ces structures n'est pas encore clairement établi mais elles peuvent être induites par la stimulation des neutrophiles par de l'IL-8, de l'IFN γ ou des LPS (Kaplan & Radic, 2012).

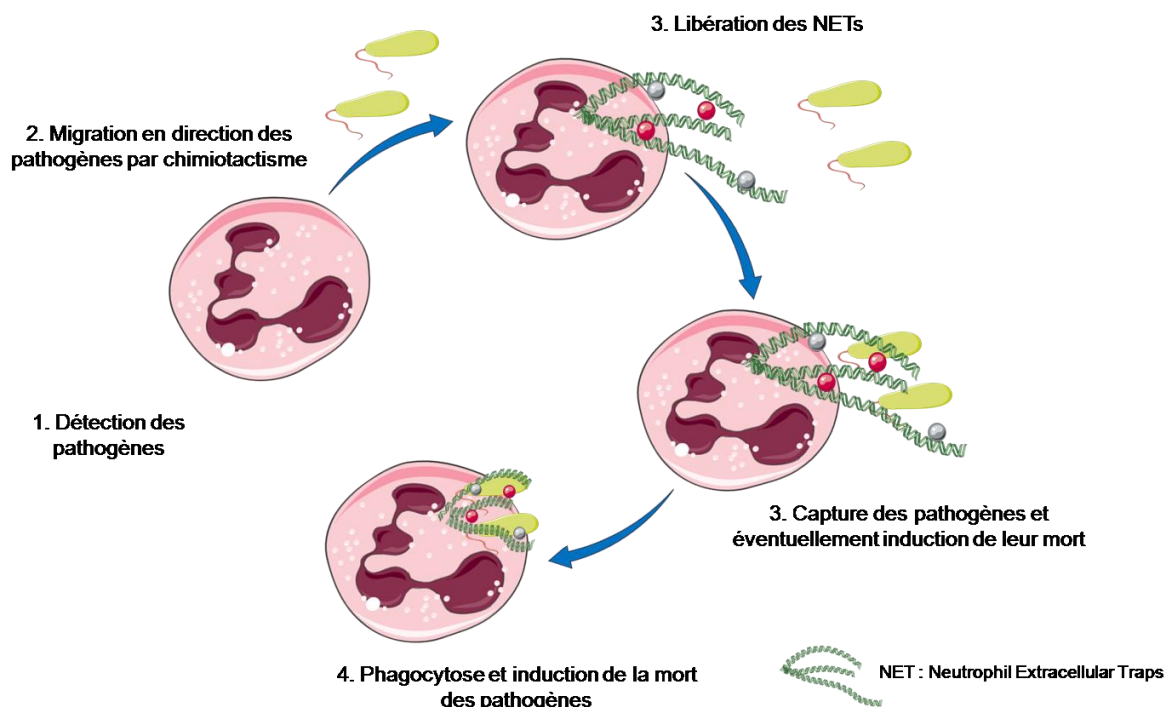


Figure 20 : formation et recapture des NET par les neutrophiles. Une fois activés par la fixation de PAMP (LPS, plaquettes, ...) sur les PRRs (TLR, ...) les neutrophiles migrent en direction des pathogènes et libèrent des fibres de chromatine condensées sur lesquelles sont fixées des protéines antimicrobiennes (myéloperoxidase, cathepsine G, ...). Ces fibres extracellulaires piègent les pathogènes et induisent leur mort, directement par action des protéines antimicrobiennes ou indirectement par phagocytose par les neutrophiles.

c) Les neutrophiles, organisateurs d'une réponse immunitaire efficace ?

Une fois activés, les neutrophiles peuvent libérer une grande variété de cytokines et de chimiokines à l'origine d'une forte inflammation locale et du recrutement et de l'activation de nombreuses cellules immunitaires. Ainsi, en plus de l'IL-1 β , l'IL-8, du GM-CSF, du TNF α , du TGF β et de l'IFN α , les neutrophiles synthétisent et sécrètent de l'IL-12, une cytokine clé entre les immunités innée et adaptative puisqu'elle régule la prolifération et la production d'IFN γ par les cellules T et les cellules NK, la présentation des antigènes par les macrophages

et les cellules dendritiques et l'activité cytolytique des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxique CD8⁺ (di Carlo et al., 2001; Mantovani et al., 2011). De plus, la libération des protéines MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein 1a), MIP-1 β et α - et β -défensines induit le recrutement de macrophages, de cellules dendritiques immatures et de lymphocytes T, permettant le développement d'une réponse immunitaire de type 1 (Müller et al., 2009; Soehnlein, Weber & Lindbom, 2009; Yang et al., 2009).

Toutefois, lorsque la réponse inflammatoire induite par les neutrophiles s'emballe, notamment du fait d'anomalies dans la résolution de l'inflammation, des effets délétères importants peuvent survenir. Ainsi, l'infiltration de neutrophiles à travers les épithéliums est une des caractéristiques des maladies inflammatoires telles que la maladie de Crohn, les colites ulcéreuses, les pyélonéphrites, l'arthrite rhumatoïde... Ces maladies sont dues en partie à la résistance à l'apoptose des neutrophiles induite par la sécrétion de cytokines anti-apoptotiques et par l'altération de l'expression des caspases (Summers et al., 2010). On observe alors le développement d'une inflammation chronique et d'un stress oxydatif causés respectivement par la libération continue de cytokines inflammatoires et par la production d'espèces réactives de l'oxygène.

2. Les neutrophiles et le cancer, amis ou ennemis ?

C'est l'ambivalence entre l'effet bénéfique d'une inflammation aiguë et l'effet délétère d'une inflammation chronique qui est à l'origine de la controverse sur le rôle joué par les neutrophiles dans la biologie des cancers.

En effet, les neutrophiles représentent une proportion significative des cellules inflammatoires infiltrant les tumeurs, notamment en raison de la sécrétion de GM-CSF, de G-CSF, d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-8, de CXCL1 et CXCL2 (De Larco, Wuertz & Furcht, 2004; Fridlender & Albelda, 2012; Kobayashi, 2008; Lechner, Liebertz & Epstein, 2010; McGary, Miele & Welch, 1995; Sparmann & Bar-Sagi, 2004). Cela a été décrit entre autre dans les cancers des poumons, du pancréas, du sein et dans les mélanomes, les neutrophiles étant fréquemment observés à proximité des cellules tumorales et des vaisseaux tumoraux, ils sont alors appelés neutrophiles associés aux tumeurs ou TAN (Tumour Associated Neutrophils).

a) Les neutrophiles au service des tumeurs

En 2009, Fridlender a démontré que les neutrophiles peuvent assumer un phénotype protumoral au sein de tumeurs non traitées, on parle alors de TAN N2 (Fridlender et al., 2009). Il est connu que les cellules tumorales et les cellules immunitaires « dialoguent » par la sécrétion de nombreuses molécules qui vont modifier le microenvironnement tumoral mais jusqu'à récemment, le rôle des neutrophiles dans ce phénomène était méconnu. On sait maintenant qu'ils peuvent favoriser la vascularisation des tumeurs en libérant de l'oncostatine M qui va induire l'augmentation de la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales (Queen et al., 2005). Il a également été démontré que la protéine MMP-9 (Matrix Metallo Proteinase), produite entre autre par les neutrophiles, prévient l'apoptose des cellules tumorales dans les poumons (Acuff et al., 2006) et favorise l'angiogénèse (Kuang et al., 2011; Nozawa, Chiu & Hanahan, 2006; Tazzyman, Lewis & Murdoch, 2009). D'autre part, la sécrétion de la neutrophile elastase augmente la croissance des cellules tumorales en activant la protéine AKT (Houghton et al., 2010) et dégrade la matrice extracellulaire, favorisant l'invasion tumorale et la formation de métastase (Doi et al., 2002; Sato et al., 2006; Sun & Yang, 2004). Enfin, il semblerait que la libération dans le microenvironnement de l'enzyme arginase1 supprime la prolifération des lymphocytes T en dégradant l'arginine extracellulaire, qui est un facteur indispensable à l'activité des cellules T (Rotondo et al., 2009). D'autres mécanismes favorisant la croissance tumorale ont été décrits et c'est pourquoi la présence de TAN est considérée comme un facteur de mauvais pronostic dans de nombreux cancers tels que les carcinomes bronchoalvéolaires, les mélanomes métastatiques où les carcinomes rénaux (figure 21) (Fridlender & Albelda, 2012).

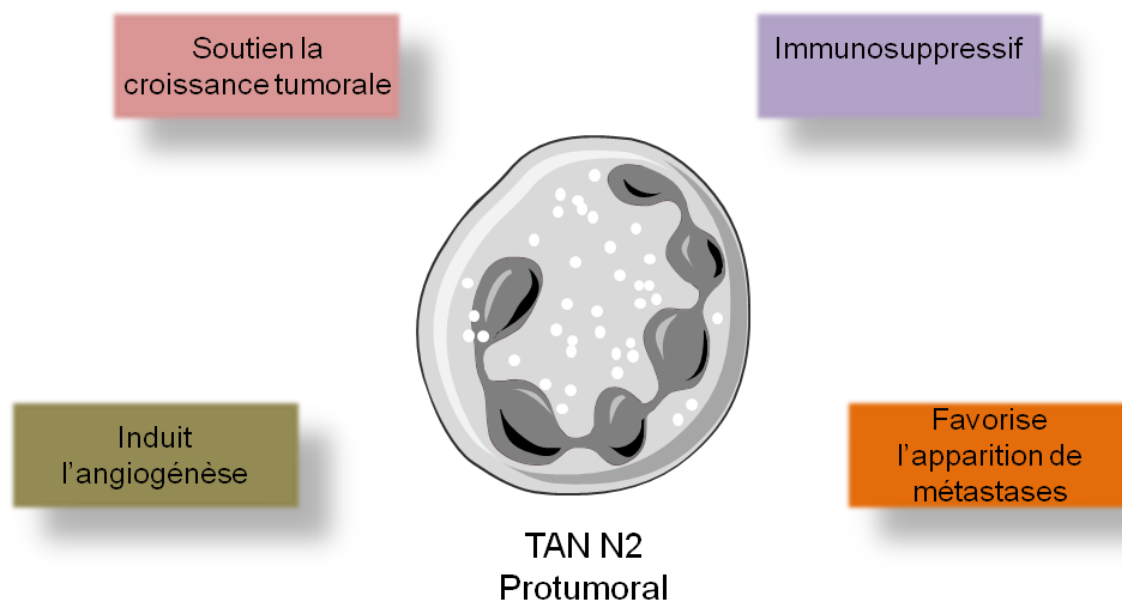


Figure 21 : neutrophile protumoral infiltrant les tumeurs. Les neutrophiles de type N2 vont favoriser la progression des tumeurs en sécrétant différentes cytokines. Ainsi, la libération de protéines membres de la famille du TNF, APRIL (a proliferation-inducing ligand) et BAFF/BLyS (B-cell-activating factor / B lymphocyte stimulator) favorise le développement des tumeurs. De plus, la sécrétion de VEGF, d'angiopoïétine et de CXCL-8 stimule le processus d'angiogénèse au sein des tumeurs. Enfin, la production de cytokines telles que le TGF- β et l'IL-10 favorise la transition épithélio-mésenchymateuse, rendant les cellules tumorales plus agressives, et inhibe la réponse immunitaire antitumorale.

b) Les neutrophiles, une arme dans la lutte contre le cancer

Cependant d'autres observations tendent à montrer que l'infiltration de neutrophiles peut être un pronostic favorable (Piccard, Muschel & Opdenakker, 2012), notamment lorsque des thérapies stimulant les neutrophiles sont utilisées (Gregory & Houghton, 2011). C'est le cas par exemple dans le traitement par instillations de BGC dans les cancers de la vessie, où il a été démontré que la présence de neutrophiles est indispensable à l'efficacité du traitement (Suttman et al., 2006).

En effet, si Fridlender a montré que les neutrophiles intratumoraux peuvent présenter un phénotype protumoral N2, il a également démontré que l'inhibition du TGF β induit un changement des neutrophiles vers un phénotype antitumoral N1 (figure 22) (Fridlender et al., 2009). En effet, à l'instar des neutrophiles intratumoraux N2 qui inhibent la réponse immunitaire antitumorale, les neutrophiles N1 possèdent des propriétés immunostimulantes

favorisant le recrutement de lymphocytes T cytotoxiques en libérant des chimiokines (CCl3, CXCL9 et 10) et des cytokines proinflammatoires (IL-12, TNF α et GM-CSF) (Beauvillain et al., 2007; Fridlender et al., 2009; Kousis et al., 2007; Scapini et al., 2000). Ils sont également capables d'activer les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4⁺ et de promouvoir une mémoire immunitaire antitumorale (Cavallo et al., 1992; van Gisbergen, Geijtenbeek & van Kooyk, 2005).

De plus, des études ont démontré que le traitement par des cytokines telles que le GM-CSF augmente la capacité des neutrophiles à tuer les cellules tumorales et à inhiber la croissance tumorale (Colombo et al., 1992; Di Carlo et al., 2001; Hicks et al., 2006). En effet, la déplétion des neutrophiles intratumoraux N1 augmente la croissance tumorale et/ou réduit l'efficacité antitumorale de traitement par immunothérapie (Kousis et al., 2007; Stoppacciaro et al., 1993; Suttman et al., 2006).

Il y a plus de 30 ans, Gerrard et Katano démontrèrent, *in vitro* et *in vivo*, la capacité des neutrophiles à détruire directement les cellules tumorales (Gerrard, Cohen & Kaplan, 1981; Katano & Torisu, 1982). Puis en 1998 Ishihara mit en évidence que les neutrophiles provenant d'animaux porteurs de tumeurs présentent une augmentation de leur activité cytotoxique, mesurée par la génération d'anions superoxydes et par la phagocytose, et une diminution de la taille et du nombre de métastases pulmonaires (Ishihara et al., 1998a; Ishihara, Iijima & Matsunaga, 1998b). De plus, Granot a prouvé en 2011 que, en réponse à la production de CCL2 par les cellules tumorales, les neutrophiles s'accumulent dans les poumons et génèrent du peroxyde d'hydrogène, inhibant la formation de métastases pulmonaires (Granot et al., 2011).

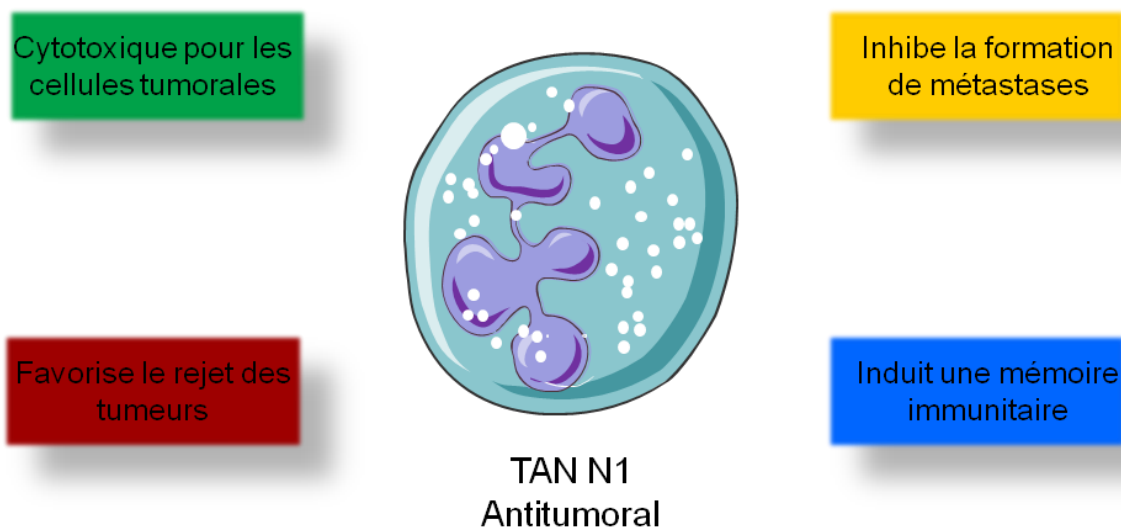


Figure 22 : neutrophile antitumoral infiltrant les tumeurs (d'après Fridlender et al. 2009). Les neutrophiles de type N1 favorisent l'élimination des tumeurs notamment en sécrétant des chimioattractants des macrophages (MIP-1 α), des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ cytotoxiques (CCL3, CXCL9, MIF) et des neutrophiles (CXCL2, CXCL8). De plus, les neutrophiles induisent la mort des cellules tumorales à l'aide de médiateurs cytotoxiques (FasL, TRAIL) et de cytokines inflammatoires (TNF α , IFN γ , IL-1 β). Enfin, en réponse à certaines cytokines produites par les tumeurs, les neutrophiles peuvent inhiber la formation de métastases en générant du peroxyde d'hydrogène.

Deux autres mécanismes impliqués dans l'effet antitumoral des neutrophiles ont été identifiés, l'expression membranaire de Fas ligand par les neutrophiles et l'induction de la cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity ADCC) (Chen et al., 2003; Fridlender et al., 2009; Hubert et al., 2011; Piccard et al., 2012).

Cependant, de manière assez surprenante, les neutrophiles antitumoraux n'expriment qu'assez peu les protéines FAS-L et TRAIL alors même qu'ils sont cytotoxiques pour les cellules tumorales. Il semble donc qu'ils soient capables d'induire l'apoptose des cellules tumorales par une voie différentes de celle impliquant les récepteurs de mort. Depuis quelques années, une controverse est née concernant la possibilité que les neutrophiles produisent et sécrètent du granzyme B.

3. Le granzyme B, présent ou non chez les neutrophiles ?

a) Les éléments de la controverse

En 1980, Grewal montre que des canaux transmembranaires sont formés par contact direct entre des neutrophiles et des cellules cibles infectées par des virus (Grewal, Carpio & Babiuk, 1980). En 2004, Christof Wagner s'appuie sur ces travaux et détecte l'expression de granzyme B dans les neutrophiles sanguins de donneurs sains. Il montre que la protéine est déjà préformée dans les granules des neutrophiles et serait impliquée dans le mécanisme d'ADCC. De plus, l'effet cytotoxique de lysats de neutrophiles sur des cellules tumorales Jurkat est fortement diminué lorsque le granzyme B est déplété (Wagner et al., 2004). Enfin, il propose que l'IFN γ faciliterait la formation d'une synapse immunologique entre le neutrophile et la cellule cible, favorisant l'action du granzyme B.

Mais la validité de ces travaux fut contestée par plusieurs équipes. Ainsi, dans le n°3 du volume 104 du mois d'août 2004 de la revue *Blood*, Metkar et Froelich affirmèrent l'absence de granzyme B dans les neutrophiles circulants de donneurs sains. Ils recherchent la présence de cette protéase par 4 méthodes, telles que la cytométrie en flux, le western blotting, un test d'activité et un ELISA et échouèrent à trouver du granzyme B dans les neutrophiles (Metkar & Froelich, 2004). Dans la même revue, Grossman et Ley arrivèrent à la même conclusion par cytométrie en flux en utilisant un anticorps anti-granzyme B directement couplé (Grossman & Ley, 2004). La controverse s'est étendue aux neutrophiles murins puisque dans un article publié en 2005 Praxedis Martin et ses collègues n'ont pas réussi à détecter de granzyme B dans des neutrophiles murins isolés de la cavité péritonéale, de la rate ou générés *ex vivo* à partir de progéniteurs de la moelle osseuse, et cela même après avoir stimulé les neutrophiles *in vivo* et *in vitro* avec différents composés dérivés de bactéries et de levures (Martin et al., 2005).

Pourtant en 2008, Wagner récidive et démontre que le granzyme B n'est pas seulement exprimé par les neutrophiles humains mais également par les lignées cellulaires myéloïdes HL-60 et U937 ainsi que par les cellules souches sanguines CD34⁺ et les neutrophiles dérivés de ces cellules *in vitro* (Wagner, Stegmaier & Hänsch, 2008). Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment publiés par Bruno et Berthou qui avaient montré la présence de granzyme B respectivement dans les cellules de leucémies myéloblastiques aigües et dans les progéniteurs CD34⁺ (Berthou et al., 1995; Bruno et al., 2000).

L'étude de l'expression du granzyme B par les neutrophiles intratumoraux n'a pour l'instant jamais été étudiée. Nous avons pu montrer au cours de ces travaux que les neutrophiles intratumoraux produisent du granzyme B et que cette expression est conditionnée par le microenvironnement tumoral.

b) Qu'est ce que le granzyme B ?

Le granzyme B est une sérine protéase de 32 kDa qui a été identifiée dans les lymphocytes T cytotoxiques en 1978 (Brunet et al., 1986; Lobe et al., 1986a; Lobe, Havele & Bleackley, 1986b; Masson & Tschopp, 1987; Young et al., 1986). Durant les années suivantes, différents travaux ont caractérisé d'autres enzymes stockées dans les granules cytoplasmiques des cellules T CD8⁺ et des cellules NK et qui appartiennent à la famille des granzymes (Hiebert & Granville, 2012). Actuellement cinq granzymes ont été décrits chez l'Homme, les granzymes A, B, H, K et M alors que onze molécules différentes ont été découvertes chez la souris (Bots & Medema, 2006). Les granzymes A et B sont les plus abondants et ont été les plus étudiés. Bien qu'on ait longtemps pensé que le granzyme B était exprimé exclusivement par les lymphocytes T cytotoxiques $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ et les cellules NK, des travaux récents ont montré qu'il pouvait être présent dans d'autres types cellulaires. Ainsi, l'expression de granzyme B a été démontrée dans des populations de cellules immunitaires telles que les lymphocytes T CD4⁺ (Namekawa et al., 1998), les mastocytes (Strik et al., 2007), les macrophages (Choy et al., 2003), les basophiles (Tschopp et al., 2006), les cellules dendritiques (Rissoan et al., 2002) et les lymphocytes T régulateurs (Grossman et al., 2004). De plus le granzyme B est également exprimé par des cellules non immunitaires telles que les kératinocytes (Hernandez-Pigeon et al., 2006), les chondrocytes (Horiuchi et al., 2003), les pneumocytes de type 2 (Vernooy et al., 2007), les cellules de Sertoli et les spermatocytes primaires (Hirst et al., 2001).

L'interleukine 2 est le principal inducteur connu de l'expression du gène du granzyme B par les lymphocytes T cytotoxiques (Liu et al., 1989) et cela indépendamment de ses effets sur la survie et la prolifération de ces cellules (Janas et al., 2005). Il a été montré qu'en l'absence d'IL-2, l'IL-15 pouvait agir en synergie avec l'IL-21 pour induire la production de granzyme B par les lymphocytes T CD8⁺ (Leonard & Spolski, 2005; Zeng et al., 2005). D'autres cytokines, dont l'IL-12, peuvent jouer un rôle dans l'expression du granzyme B et l'activité

cytotoxique des cellules NK (Yamamoto et al., 2002). Des travaux récents ont montré que l'expression du gène du granzyme B est soumise à une régulation post-transcriptionnelle. En effet, chez la souris, les cellules NK non activées présentent d'abondantes quantités de transcrit du gène du granzyme B mais n'expriment pas la protéine et sont peu cytotoxiques. Une fois activés, on observe une augmentation très importante de la quantité de granzyme B synthétisé sans changement significatif de la quantité d'ARNm (Fehniger et al., 2007). Ces résultats ont été confortés par une étude portant sur l'expression du granzyme B par les cellules dendritiques plasmacytoïdes qui a mis en évidence le même phénomène (Rissoan et al., 2002). De même, les cellules T cytotoxiques mémoires présentent d'abondante quantité d'ARNm mais pas la protéine (Kaeck et al., 2002).

Le granzyme B est synthétisé dans le réticulum endoplasmique sous la forme d'une pro-enzyme inactive. Dans l'appareil de Golgi, des molécules de mannose-6-phosphates sont ajoutés et permettent l'adressage de la pro-enzyme dans les granules cytotoxiques primaires où le granzyme B est activé par clivage par la cathepsine G du dipeptide situé à l'extrémité N-terminale de la protéine (Chowdhury & Lieberman, 2008).

Lorsque les cellules CD8⁺ et NK sont activées, les granules cytotoxiques migrent vers la membrane des cellules où ils s'alignent avant de fusionner avec la membrane plasmique et de délivrer leur contenu dans la synapse immunologique (Bossi & Griffiths, 2005; Bromley et al., 2001). Le mécanisme par lequel le granzyme B pénètre dans la cellule cible n'est pas encore complètement décrit. Originellement, on pensait que le granzyme B pénétrait dans la cellule cible à travers des pores formés dans la membrane plasmique par une protéine appelée perforine. Il semble plutôt que les pores formés par la perforine induisent un influx calcique à l'origine de l'endocytose de la membrane plasmique et des molécules qui y sont liées, notamment le granzyme B (Keefe et al., 2005). En effet, des travaux ont montré que le granzyme B peut se lier aux récepteurs au mannose-6-phosphates présents à la surface des cellules cibles (Veugelers et al., 2006) ainsi qu'à d'autres molécules telles que la protéine de choc thermique HSP-70 (Gross et al., 2003). De plus, de nombreuses études tendent à montrer que l'endocytose du granzyme B peut s'effectuer selon des mécanismes indépendants de la perforine (Froelich et al., 1996; Motyka et al., 2000; Pinkoski et al., 1998; Shi et al., 1997). Une fois libéré, le granzyme B induit la mort par apoptose de la cellule cible, notamment en activant les caspases dont la principale caspase effectrice, la caspase 3 (figure 23) (Adrain,

Murphy & Martin, 2005; Darmon, Nicholson & Bleackley, 1995). De plus, le granzyme B pénètre dans le noyau de la cellule où il clive des protéines cibles des caspases telles que la lamine B et la protéine PARP-1 (Hengartner, 2000). Le granzyme B est également capable d'activer la voie mitochondriale de l'apoptose, induisant la génération d'espèces réactives de l'oxygène, la chute du potentiel transmembranaire mitochondriale et la libération dans le cytoplasme du cytochrome c et d'autres molécules proapoptotiques (Heibein et al., 2000; Pinkoski et al., 2001; Talanian et al., 1997).

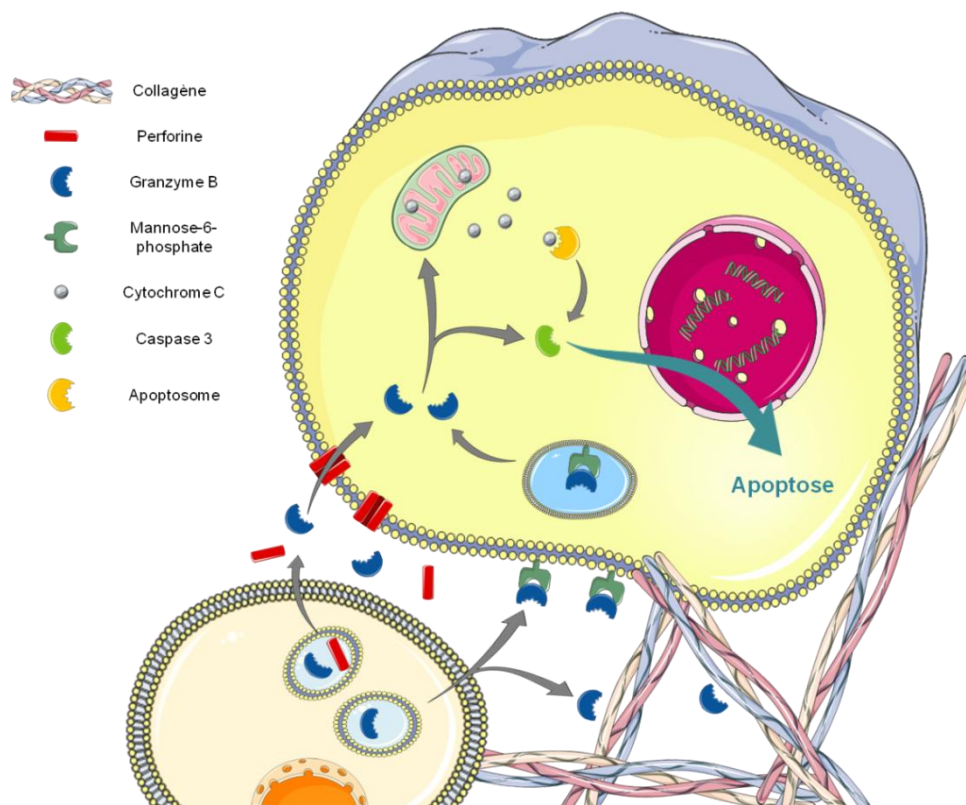


Figure 23 : les différents mécanismes d'action du granzyme B. Le granzyme B contenu dans les granules des cellules effectrices (lymphocyte T cytotoxique, cellules NK, neutrophiles) est libéré dans l'espace extracellulaire et pénètre dans la cellule cible par fixation à des récepteurs membranaires (mannose-6-phosphates) ou par endocytose provoqué par un influx calcique dû à la formation de pores par la perforine dans la membrane plasmique de la cellule cible. Le granzyme B va alors d'une part activer la caspase 3 par clivage et d'autre part induire la libération dans le cytoplasme du cytochrome c présent dans les mitochondries, activant ainsi les voies de l'apoptose. Le clivage de protéines nucléaires (lamine B et PARP-1) permet également d'induire la mort de la cellule effectrice. Enfin, le granzyme B exerce une activité protéolytique sur les protéines composant la matrice extracellulaire, contribuant au remodelage des tissus.

Jusqu'à récemment, seuls les effets intracellulaires du granzyme B, et spécialement son rôle dans l'induction de l'apoptose, étaient étudiés. Cependant, il a été initialement décrit comme une protéase intra et extracellulaire, c'est pourquoi depuis quelques années de plus en plus de chercheurs s'intéressent aux effets extracellulaire du granzyme B (Boivin et al., 2009; Sayers et al., 1992; Sower et al., 1996). En effet, plusieurs équipes ont montré la présence de granzyme B dans la matrice extracellulaire et dans les fluides corporels tels que le sang ou le fluide synovial (Buzza & Bird, 2006; Romero & Andrade, 2008) où il pourrait être impliqué entre autre dans des maladies telles que l'arthrite, la sclérose et différentes pathologies vasculaires (Boivin et al., 2009). C'est pourquoi la régulation de cette enzyme protéolytique est indispensable pour maintenir l'homéostasie tissulaire et prévenir l'apparition de dommages délétères.

Le principal inhibiteur spécifique du granzyme B identifié chez l'Homme appartient à la famille des serpins, il s'agit de l'inhibiteur des protéases (proteinase inhibitor PI) 9 (PI-9). Il est exprimé par les cellules immunitaires (Bladergroen et al., 2001; Bots et al., 2007; Hirst et al., 2003; Sun et al., 1996), les cellules endothéliales et mésothéliales (Buzza et al., 2001), les hépatocytes (Kanamori et al., 2000) et les cellules musculaires lisses vasculaires (Young et al., 2000). La protéine SPI-6 (serpin protease inhibitor-6) est l'homologue murin de PI-9 (Sun et al., 1997). Des études réalisées à partir de tumeurs solides et de lymphomes humains et murins suggèrent que la surexpression des protéines PI-9 et SPI-6 pourrait participer aux mécanismes d'échappements des tumeurs à la mort induite par le granzyme B (Bladergroen et al., 2002; Medema et al., 2001; Zhang et al., 2006).

Objectif de mes travaux de recherche de doctorat

Le nombre de nouveaux cas de cancer ne cesse d'augmenter d'année en année et parmi ceux-ci le cancer colorectal est le deuxième plus fréquent. Les malades sont généralement traités par chirurgie et/ou par chimiothérapie. Néanmoins, lorsque les patients sont diagnostiqués à un stade avancé de la maladie, le taux de survie à 5 ans est très faible. En effet, seul un patient sur deux est encore en vie 5 ans après la découverte du cancer si celui-ci a déjà atteint le stade de carcinome. Le pronostic est encore plus sombre pour les malades ayant développé des métastases puisque 95% d'entre eux décèdent dans les cinq ans. C'est pourquoi il est important d'explorer d'autres approches thérapeutiques afin de pouvoir proposer des alternatives aux malades.

Notre laboratoire s'intéresse depuis de nombreuses années au développement de traitements par immunothérapie. Plusieurs modèles animaux ont été développés afin d'étudier l'efficacité antitumorale d'un analogue de lipide A bactérien ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu. Ainsi, des études réalisées précédemment dans notre équipe ont montré que 95 % des rats porteurs de carcinomatoses péritonéales sont guéris par des injections répétées de lipide A. De plus l'expression de la NO synthase inductible, la production de monoxyde d'azote dans les tumeurs et la libération de cytokines inflammatoires (IL-1 β , TNF α et IFN γ) ont été corrélées à l'efficacité antitumorale du traitement par le lipide A.

Cependant, l'efficacité du traitement par le lipide A est fortement réduite lorsque les rats sont porteurs de carcinomatoses plus développées. Néanmoins une injection préalable d'oxaliplatine permet de restaurer l'effet antitumoral de l'immunothérapie par le lipide A.

La première partie de mes travaux de thèse a consisté à approfondir l'étude des mécanismes d'action du lipide A en monothérapie et notamment l'implication des neutrophiles dans l'efficacité antitumorale de l'immunothérapie par le lipide A.

La seconde partie de mes travaux de thèse a consisté à étudier les modifications induites par l'oxaliplatine à l'origine de la restauration de l'efficacité de l'immunothérapie par le lipide A et notamment l'implication de la sénescence des cellules tumorales dans ce processus.

Ces travaux montreront que l'association de la sénescence avec une immunothérapie est une approche intéressante pour traiter les patients atteints de cancer avancés.

MATERIEL & METHODES

I. Culture cellulaire et modèles animaux

1. Culture cellulaire

a) La lignée PROb

Obtenue à partir d'un carcinome colique (tumeur DHD) chimio-induit par la 1,2-diméthylhydrazine chez un rat de la souche BD-IX, les cellules PROb sont adhérentes et présentent une morphologie de type épithéliale. La lignée est issue d'un clone déposé à l'European Collection of Cell Culture (EACC) sous la référence DHD/K12/TRb.

Les cellules PROb sont cultivées en flasque de culture hermétique (Nunc A/S, Polylabo, Strasbourg, France) à 37°C en atmosphère sèche sans CO₂. Elles se développent en milieu de culture HAM's F10 (Biowhittaker, Fontenay-sous-Bois, France) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco BRL, Eriny, France) et présentent un temps de doublement de la population d'environ 20h. Lorsque les cellules sont à 80-90% de confluence dans les flasques, elles sont rincées avec du milieu HBSS (Biowhittaker) sans calcium ni magnésium puis décrochées du fond de la flasque par incubation pendant 5 minutes à 37°C dans du milieu HBSS additionné de 20% de trypsine (Biowhittaker) et de 20% d'EDTA 1%. L'ajout de milieu HAM's F10 complet permet de récupérer les cellules PROb et d'inactiver la trypsine, les cellules sont centrifugées 3 minutes à 500g puis remises en culture à la concentration souhaitée.

b) La lignée CT26

Obtenue à partir d'un carcinome colique indifférencié chimio-induit par le N-nitroso-N-méthyluréthane chez une souris de la souche BALB/C, les cellules de la lignée CT26 sont adhérentes et présentent une morphologie de type fibroblastique. La lignée est issue d'un clone cellulaire déposé à l'American Type Culture Collection (ATCC) sous la référence CT26.WT (ATCC CRL-2638).

Les cellules CT26 sont cultivées en flasque de culture hermétique (Nunc A/S, Polylabo, Strasbourg, France) à 37°C en atmosphère sèche sans CO₂. Elles se développent en milieu de culture RPMI (Biowhittaker, Fontenay-sous-Bois, France) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco BRL, Eriny, France) et présentent un temps de doublement de la population d'environ 14h. Lorsque les cellules sont à 80-90% de confluence dans les flasques, elles sont rincées avec du milieu HBSS (Biowhittaker) sans calcium ni magnésium puis décrochées du fond de la flasque par incubation pendant 5 minutes à 37°C dans du milieu HBSS additionné de 10% de trypsine (Biowhittaker) et de 10% d'EDTA 1%. L'ajout de milieu RPMI complet permet de récupérer les cellules CT26 et d'inactiver la trypsine, les cellules sont centrifugées 3 minutes à 500g puis remises en culture à la concentration souhaitée.

Les lignées cellulaires cancéreuses coliques sont régulièrement testées par un test biochimique pour vérifier l'absence de contamination des cultures par des mycoplasmes, notamment quelques passages après la décongélation des cellules et avant l'injection de ces cellules aux animaux.

2. Modèles animaux de tumeurs

a) Modèle de carcinomatoses péritonéales chez le rat BD IX

Nous avons utilisé des rats de la souche BD IX, établie en 1937 par H. Druckrey, commandés chez l'animalier Charles River et hébergés à l'animalerie centrale de l'université de Bourgogne. Les animaux étaient âgés de 3 à 5 mois durant les expérimentations qui ont toutes faites l'objet d'un protocole soumis et accepté par le comité d'éthique de Dijon.

Les carcinomatoses péritonéales sont induites, chez les rats BD IX anesthésié à l'isoflurane par injection intrapéritonéale (i.p.) de 10⁶ cellules PROb en suspension dans 3 mL de milieu HAM's F10. Les animaux meurent entre 6 à 12 semaines après injection des cellules. L'autopsie des rats met en évidence la production d'ascite hémorragique ainsi que l'invasion de la cavité péritonéale par des tumeurs macroscopiques.

Deux protocoles de traitement par un lipide A, l'OM-174, ont été mis au point dans notre laboratoire :

✓ *Immunothérapie par le lipide A seul*

Dans ce protocole le traitement des animaux débute 14 jours après injection des cellules PROb et consiste en l'injection intraveineuse (i.v.) de lipide A à 1 mg.kg^{-1} trois fois par semaine durant 5 semaines consécutives (figure 24). Dans ces conditions, le traitement guérit 95% des rats porteurs de tumeurs.

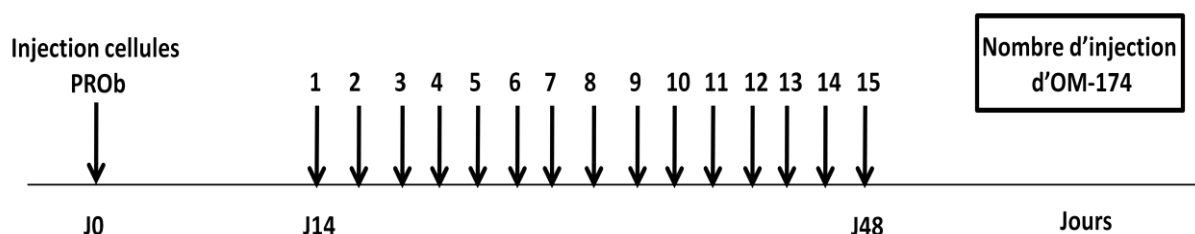


Figure 24 : protocole de traitement par immunothérapie par le lipide A seul chez le rat BD IX.

Dans ce protocole, les rats sont séparés en deux groupes dont l'un reçoit le traitement tandis que l'autre reçoit des injections de sérum physiologique et constitue le groupe contrôle. Des prélèvements sont effectués 6h (J14), 24h (J15), 3 jours (J17) et 9 jours (J22) après la première injection de lipide A (figure 25). Pour cela, à chaque temps, 3 rats de chaque groupe sont anesthésiés à l'isoflurane puis sacrifiés par dislocation cervicale. La rate, les fémurs et tibias (contenant la moelle osseuse) sont prélevés et mis dans du milieu HAM's F10. Les tumeurs sont séparées en deux, une partie est congelée directement en azote liquide puis conservée à -80°C tandis que l'autre partie est mise en formol 4% avant d'être incluse en bloc de paraffine ou en OCT en vue d'étude histologiques ultérieures.

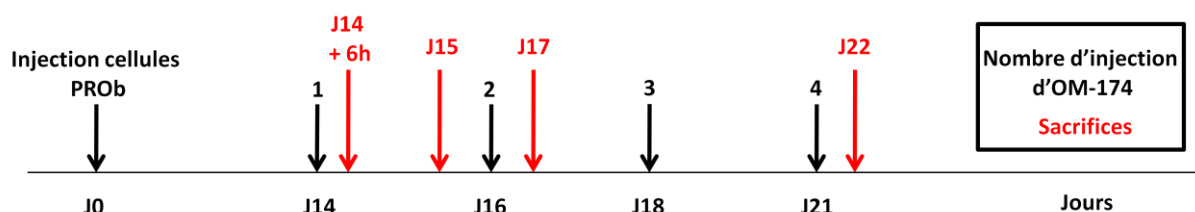


Figure 25 : schéma des prélèvements.

✓ Immunothérapie combinée à une chimiothérapie

Lorsque le début du traitement est plus tardif le traitement par le lipide A perd de son efficacité, il devient alors nécessaire d'effectuer une injection préalable d'un agent chimiothérapeutique couramment utilisé dans le traitement des cancers du côlon : l'oxaliplatine.

Dans ce protocole le traitement des animaux débute 21 jours après injection des cellules PROb et consiste en l'injection i.p. d'oxaliplatine à 3 mg.kg⁻¹, suivi à partir du 28^{ème} jour de 15 injections i.v. de lipide A à 1 mg.kg⁻¹ trois fois par semaine durant 5 semaines consécutives (figure 26). Dans ces conditions, le traitement guérit 95% des rats porteurs de tumeurs.

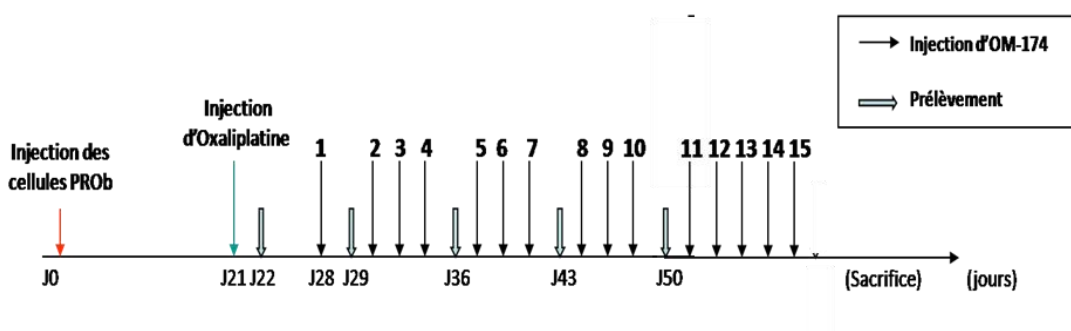


Figure 26 : protocole de traitement par immunothérapie par le lipide A associée à l'oxaliplatine chez le rat BD IX.

Dans ce protocole, les rats sont séparés en quatre groupes : Contrôle (sérum physiologique), Oxaliplatine, Lipide A et Oxaliplatine/Lipide A. Des prélèvements sont effectués dans chaque groupe 24h après l'injection d'oxaliplatine (J22) et après les 1^{ère} (J29), 4^{ème} (J36), 7^{ème} (J43) et 10^{ème} (J50) injections de lipide A. Pour cela, à chaque temps, 3 rats de chaque groupe sont anesthésiés à l'isoflurane puis sacrifiés par dislocation cervicale. Les tumeurs sont séparées en deux, une partie est congelée directement en azote liquide puis

conservée à -80°C tandis que l'autre partie est mise en formol 4% avant d'être incluse en bloc de paraffine ou en OCT en vue d'étude histologiques ultérieures.

b) Modèle de tumeurs sous-cutanées chez la souris Balb/C

Nous avons utilisé des souris de la souche Balb/cByJ, établie en 1974 par G.D. Snell, commandées chez l'animalier Charles River et hébergées à l'animalerie centrale de l'université de Bourgogne. Les animaux étaient âgés de 2 à 4 mois durant les expérimentations qui ont toutes faites l'objet d'un protocole soumis et accepté par le comité d'éthique de Dijon.

Les tumeurs sous-cutanées sont induites, chez une souris Balb/C anesthésiée à l'isoflurane, par injection sous-cutanée (s.c.) de 5.10^5 cellules CT26 en suspension dans 100 μ L de sérum physiologique. Les animaux sont euthanasiés lorsque le volume tumoral dépasse 2000 mm³.

Un protocole de traitement par immunothérapie par un lipide A a été mis au point dans notre laboratoire. Le traitement des animaux débute 3 jours après l'injection des cellules CT26 et consiste en 5 injections intraveineuses (i.v.) de lipide A à 8 mg.kg⁻¹ réalisées à 5 jours d'intervalle (figure 27).

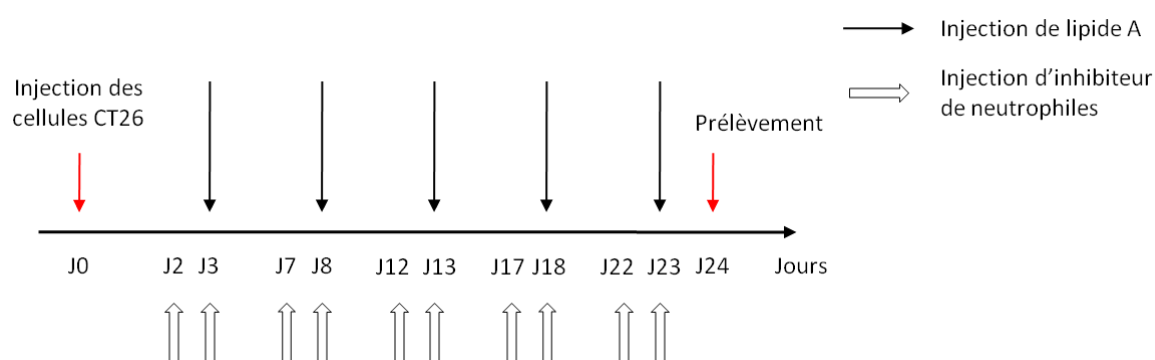


Figure 27 : protocole de traitement par immunothérapie par le lipide A chez la souris Balb/C.

Dans ce modèle, nous avons inhibé le recrutement intra-tumoral des neutrophiles en induisant leur déplétion à l'aide d'anticorps, le Ly6G spécifique des neutrophiles et le RB6-8C5 spécifique des granulocytes, ou en bloquant leur recrutement avec le SB 225002 (Tocris

Bioscience, R&D System, Lille), un antagoniste de CXCR2, le récepteur aux chimioattractants CXCL1, 2 et 5. Les injections de ces produits ont été réalisées la veille et le jour des injections de lipide A aux concentrations de 5 mg.kg⁻¹ pour le Ly6G, de 2,5 mg.kg⁻¹ pour le RB6-8C5 et de 4 mg.kg⁻¹ pour le SB225002.

La progression tumorale est évaluée par mesure du volume tumoral avec un pied à coulisse et en utilisant la formule de calcul :

$$\text{Volume Tumoral (mm}^3\text{)} = (\text{Largeur en mm} \times \text{Largeur en mm} \times \text{Longueur en mm}) / 2$$

c) Modèle de carcinomatoses péritonéales chez la souris Balb/C :

Les carcinomatoses péritonéales sont induites chez une souris Balb/C anesthésiée à l'isoflurane par injection intrapéritonéale (i.p.) de 5.10⁵ cellules CT26 en suspension dans 100 µL de sérum physiologique. Les animaux meurent entre 3 à 4 semaines après injection des cellules. L'autopsie des souris met en évidence la production d'ascite hémorragique ainsi que l'invasion de la cavité péritonéale par des tumeurs macroscopiques.

Un protocole de traitement par immunothérapie par un lipide A combiné à une chimiothérapie par oxaliplatine a été mis au point dans notre laboratoire. Le traitement des animaux débute 5 jours après l'injection des cellules CT26 et consiste en l'injection i.p. d'oxaliplatine à 3 mg.kg⁻¹, suivi à partir du 10^{ème} jours de 5 injections i.v. de lipide A à 8 mg.kg⁻¹ réalisées à 5 jours d'intervalle (figure 28).

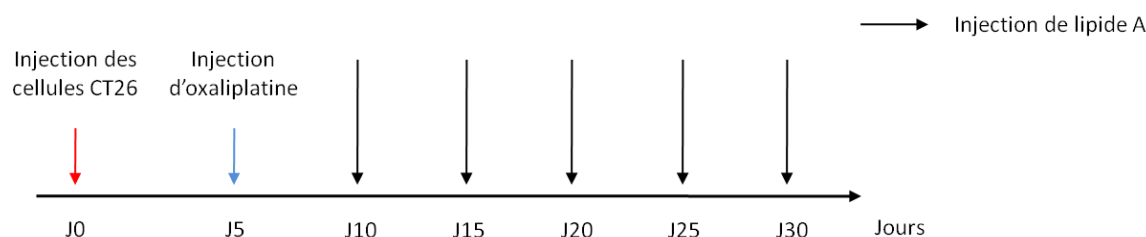


Figure 28 : protocole de traitement par immunothérapie par le lipide A associée à l'oxaliplatine chez la souris Balb/C.

II. Obtention de cellules tumorales CT26 surexprimant la serpine B9

Les cellules tumorales CT26 sont ensemencées la veille de la transfection dans le but d'obtenir une confluence de 70% le jour de la transfection. Une heure avant la transfection, du milieu de culture neuf est ajouté sur les cellules puis le mélange transfectionnel est préparé. 5 µg d'ADN plasmidique est dilué dans de l'eau distillée stérile q.s.p. 450 µL, additionné de 50 µL d'une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) à 2,5 M, 500 µL de tampon HBS 2X est ensuite ajouté et on laisse incuber le mélange pendant 5 minutes à température ambiante. On ajoute ensuite le mélange transfectionnel goutte à goutte sur les cellules puis on laisse incuber pendant 4 à 16h à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS 1X stérile et du milieu neuf est ajouté pendant 48 à 72h avant d'ajouter la néomycine à une concentration de 100 µg.mL⁻¹. La sélection se fait en boîte de Pétri durant le temps nécessaire pour tuer toutes les cellules contrôles non transfectées, on réalise alors une dilution limite en plaque 96 puits.

III. Isolement et culture des cellules immunitaires

1. Les neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont isolés à partir de la rate et de la moelle osseuse des animaux. Les protocoles d'isolements sont les mêmes quelque soit l'origine des prélèvements (rat ou souris).

a) Isolement à partir de la rate

Après sacrifice de l'animal, la rate est prélevée puis plongée dans du milieu de culture (HAM's F10 ou RPMI selon que le prélèvement est effectué chez le rat BD-IX ou chez la souris BALB/c respectivement) additionné de 1% d'un mélange d'antibiotiques PSA (Pénicilline, Streptomycine, Amphotéricine B). En salle de culture cellulaire, sous un PSM et en boîte de Pétri stérile, la rate est broyée au moyen d'un piston de seringue de 10 mL sur un tamis cellulaire en nylon de 70 µm de porosité (BD Bioscience, Belgique) dans 5 mL de milieu de culture additionné de PSA. La suspension cellulaire ainsi obtenue est transférée

dans un tube falcon de 50 mL à l'aide d'une seringue à aiguilles 18G puis le tamis est rincé trois fois.

b) Isolement à partir de la moelle osseuse

Après sacrifice de l'animal, les tibias et fémurs des pattes arrières de l'animal sont prélevés et plongés dans du milieu de culture additionné de 1% de PSA. En salle de culture cellulaire, sous un PSM et en boîte de Pétri stérile, les épiphyses des os sont coupées et la moelle osseuse est obtenue par rinçage de la cavité osseuse au moyen d'une aiguille de 25G avec 10 mL de milieu de culture additionné de PSA.

c) Purification des neutrophiles

Les suspensions cellulaires obtenues précédemment (rate, moelle osseuse) sont centrifugées 5 minutes à 450 g puis les hématies sont lysées par incubation pendant 30 secondes dans 2 à 4 mL d'une solution de NaCl à 0,2%, le même volume d'une solution de NaCl à 1,6% est alors ajouté afin d'obtenir une suspension cellulaire en solution isotonique à 0,9% de NaCl. Du milieu complet (HAM's F10 ou RPMI additionné de 10% de SVF Endotoxine Free inactivé par chauffage 30 minutes à 56°C et de 1% de PSA) est ajouté en quantité suffisante pour (qsp) 20 mL et la suspension est alors centrifugée 10 minutes à 450 g à 4°C.

Les neutrophiles sont purifiés à l'aide de kits commerciaux de purification de la firme Miltenyi Biotec. Le tri est réalisé en accord avec les informations fournies par le fabricant. Brièvement, les cellules sont remises en suspension dans du tampon Miltenyi (0,5% BSA, 2 mM EDTA, PBS 1X) et incubées 10 minutes à 4°C après ajout d'anticorps spécifique des neutrophiles (HIS48 de AbD Serotec pour le rat, Ly6G-Biotine Miltenyi Biotec pour la souris). Les cellules sont ensuite incubées dans un mélange de tampon Miltenyi et de billes magnétiques (rat anti mouse IgM MicroBeads, Miltenyi Biotec pour le rat, anti-Biotine MicroBeads, Miltenyi Biotec pour la souris) à 4°C durant 15 minutes. Les neutrophiles sont alors purifiés par sélection positive sur colonne magnétique par AUTOMACS. Après vérification, la fraction positive est composée à plus de 95% de polynucléaires neutrophiles.

d) Culture des neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont mis en culture dans du milieu additionné de 10% de SVF Endotoxine free inactivé et de 1% de PSA à la concentration de 10^6 cellules par mL en plaques 6 puits à raison de 2.10^6 cellules par puits. Ces cellules sont alors traitées ou non par 1 ng.mL^{-1} d'IL-2 recombinante (Biolegend), 1 ng.mL^{-1} d'IL-12 (R&D Systems), 100 ng.mL^{-1} d'IL-21 (eBioscience) et 250 U.mL^{-1} d'IFN γ (R&D Systems) pendant 18h. Ces cellules sont alors traitées par $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de lipide A pendant 6h. Les surnageants des neutrophiles sont alors collectés et mis pendant 24h au contact de cellules PROb implantés la veille en plaque 96 puits à la concentration de 2.10^4 cellules par puits. Un inhibiteur de granzyme B, le Z-AAD-CMK (Calbiochem MERK, Allemagne), utilisé à la concentration de $50 \text{ }\mu\text{M}$, est ajouté dans certain puits. La cytotoxicité des surnageant est évalué à 24h par un test au bleu de méthylène. Une fraction des surnageants de culture des neutrophiles est conservée afin de réaliser le dosage du granzyme B par E.L.I.S.A.

2. Les macrophages

Les macrophages sont isolés à partir de la cavité péritonéale des animaux. Le recrutement des macrophages est induit par une injection i.p. de 3 mL d'une solution de PBS à 10% de thioglycolate effectuée 72h avant le sacrifice des animaux. Les animaux sont euthanasiés par dislocation cervicale puis l'abdomen est désinfecté avec de l'éthanol 70°, une incision est alors réalisée afin de séparer la peau du péritoine sans percer ce dernier. A l'aide d'une seringue, du milieu froid additionné de 5000 UI.mL^{-1} d'héparine est injecté dans la cavité péritonéale, les macrophages présents sont mis en suspension et le liquide péritonéale est aspiré afin de les prélever. Les cellules sont alors centrifugées, comptées en cellule de Malassez puis mises en culture en plaque 6 puits à raison de 2.10^6 cellules dans 3 mL de milieu de culture. Après 4h, les cellules non adhérentes sont éliminées par lavage et les macrophages sont alors traités pendant 24 et 48h avec de l'IFN γ et/ou du lipide A. L'activation des macrophages est ensuite mesurée par dosage des nitrites présents dans le milieu de culture.

IV. Dosages et cytotoxicité

1. Lyse des tumeurs

Un morceau de tumeur congelé dans un bain d'azote liquide et conservé à -80°C est broyé dans du tampon de lyse (NP-40 à 1%, tris-HCl (pH 8,0) à 20 mM, NaCl à 137 mM, glycérol à 10%, EDTA à 2 mM) en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*Complete*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) à l'aide d'un Ultra-Turrax® T25 à 4°C, puis soniqué et centrifugé à 16 000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite collecté avant d'être dosé à l'aide du kit Bio-Rad *Dc Protein Assay* (Bio-Rad, Ivry-sur-Seine, France) selon les instructions du fournisseur.

2. Lyse des cellules

Trois à cinq millions de cellules en phase exponentielle de croissance sont lysées dans 0,1 mL de tampon de lyse NP40 (NP-40 à 1%, tris-HCl (pH 8,0) à 20 mM, NaCl à 137 mM, glycérol à 10%, EDTA à 2 mM) en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases pendant 15 minutes à 4°C. Le lysat est alors soniqué, centrifugé à 16 000 g 20 minutes à 4°C avant d'être dosé à l'aide du kit Bio-Rad *Dc Protein Assay*.

3. Détection des cytokines par « cytokine arrays »

Cette technique est utilisée pour détecter la présence, dans des lysats de tumeurs et dans des séra de rats, de 29 cytokines. Nous avons utilisé le kit de cytokine array « Kit Proteome Profiler™, Rat Cytokine Array Panel A Array Kit » en accord avec le protocole fourni par la firme R&D Systems. Ce système repose sur la fixation d'anticorps spécifique sur une membrane permettant de détecter les molécules suivantes : CINC-1,-2,-3 ; CNTF ; Fracktalkine ; GM-CSF ; sICAM-1 ; IFN γ ; IL-1 α ; IL-1 β ; IL-1ra ; IL-2,-3,-4,-6,-10,-13,-17 ; IP-10 ; LIX ; L-Selectin ; MIG ; MIP-1 α , -3 α ; RANTES ; Thymus Chemokine ; TIMP-1 ; TNF α ; VEGF.

Brièvement, l'échantillon est préalablement incubé 1h avec l'anticorps anti-rat, puis ce mélange est incubé avec les membranes de cytokine array toute la nuit à 4°C sous agitation. Les complexes cytokines / anticorps sont alors capturés par des anticorps fixés sur les

membranes puis révélés par chimioluminescence. Les films autoradiographiques ont été scannés et les mesures des densités optiques des spots ont été obtenu grâce au logiciel d'analyse « ImageJ ».

4. Détection de protéines par E.L.I.S.A.

Les dosages E.L.I.S.A. (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) ont été réalisés avec des kits de la compagnie Usn Life Science Inc (Euromedex, France).

Brièvement, les analyses sont réalisées en plaque 96 puits dans lesquelles sont fixés des anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt. Les échantillons à doser sont incubés avec un anticorps biotinylé puis sont ensuite déposés dans la plaque ainsi qu'une gamme étalon préparée à partir de protéines recombinantes. Puis une solution de streptavidine-HRP (horseradish peroxydase) est ajoutée, la streptavidine va alors se fixer sur la biotine fixée à la protéine cible. Enfin, une solution contenant le substrat de la peroxydase et une substance chromogène est ajoutée, une réaction colorée se produit, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présentes. La réaction est stoppée par l'ajout d'une solution d'acide chlorhydrique et la densité optique est déterminée à 450 nm. La quantité de protéines dans les échantillons est alors calculée par rapport à la gamme étalon de protéines recombinantes.

5. Dosage des nitrites par le test de Griess

Dans une plaque 96 puits, 100 μ L de réactif de Griess est ajouté à 100 μ L de surnageant de culture. Après 15 minutes d'incubation, l'absorbance de chaque puits est mesurée à 550 nm contre 690 nm par spectrométrie. La concentration en nitrites de chaque puits est calculée par rapport à une gamme étalon dont les concentrations sont comprises entre 0 et 50 μ M de nitrites.

Le réactif de Griess est un mélange volume à volume de deux solutions :

- Solution A : 0,1 % de N-1-Naphtyléthylène-diamine hypochloride
- Solution B : 1 % de p-Aminobenzène-sulfonamide repris dans une solution d'acide phosphorique (H_3PO_4) à 5 %.

6. Test de cytotoxicité au bleu de méthylène

Après ensemencement et traitement des cellules en plaque 96 puits, les surnageants de culture sont éliminés et les cellules sont rincées avec du PBS 1X puis fixées à l'éthanol absolu froid (-20°C) pendant 10 minutes. Après élimination de l'éthanol, les cellules sont colorées pendant 10 minutes par une solution de bleu de méthylène à 5% en tampon borate, le bleu de méthylène pénètre dans les cellules fixées et n'est pas éliminé par les rinçages à l'eau successifs. Une fois les plaques séchées, les cellules fixées et colorées en bleu sont lysées par une solution d'acide chlorhydrique 0,1 M et la mesure de l'absorbance à 590 nm des puits est réalisée par un spectrophotomètre. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de cellules présentes dans les puits.

V. Etude de l'expression des gènes

1. Extraction et amplification des ARNs

a) Extraction des ARNs

Deux techniques d'extraction différentes ont été utilisées.

✓ *Extraction des ARN totaux avec le kit Qiagen*

L'extraction est réalisée en accord avec les recommandations du fournisseur. Les cellules sont lysées et homogénéisées dans du tampon de lyse (tampon du fournisseur) à l'aide d'une seringue et d'une aiguille. Les tumeurs sont broyées et homogénéisées dans du tampon de lyse en utilisant un Ultra-Turrax (ULTRA -TURRAX® T25, IKA®). Les ARNs totaux sont ensuite séparés et récupérés à l'aide du kit RNeasy® Midi kit selon les conditions préconisées par le fournisseur (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Brièvement, après ajout d'éthanol, les lysats sont déposés sur colonne de silice puis centrifugés 5 minutes à 40 000 g. L'ADN génomique est éliminé par incubation de la colonne

en présence de DNase I (Qiagen, Courtaboeuf, France). La colonne est ensuite lavée à l'aide de différents tampons puis les ARN sont élués avec de l'eau dépourvue de RNase.

Les ARN sont dosés par la mesure de la densité optique (DO) à 260 nm (1 unité DO = 40 µg d'ARN/ml) à l'aide d'un Nanodrop. La pureté des échantillons est vérifiée par le rapport des $DO^{260\text{ nm}} / DO^{280\text{ nm}}$ qui doit être compris entre 1,7 et 2,2. Les ARN sont conservés à -80°C à une concentration de 250 ng/µl.

✓ *Extraction des ARN totaux par le Trizol*

L'extraction est réalisée en accord avec les recommandations du fournisseur. Les cellules sont lysées par ajout de 1 mL de trizol. Les tumeurs sont broyées et homogénéisées dans 1 mL de trizol en utilisant un Ultra-Turrax (ULTRA -TURRAX® T25, IKA®). Après 5 minutes d'incubation, 200 µL de chloroforme est ajouté et les échantillons sont vortexés afin de mélanger les deux phases. Les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 12 000 g à 4°C puis un second lavage au chloroforme est réalisé. Les ARNs sont alors précipités par ajout d'isopropanol, centrifugés 10 minutes à 18 000g à 4°C et lavés deux fois avec de l'éthanol 75° avant d'être solubilisés dans de l'eau dépourvue de RNase.

Les ARN sont dosés par la mesure de la densité optique (DO) à 260 nm (1 unité DO = 40 µg d'ARN/ml) à l'aide d'un Nanodrop. La pureté des échantillons est vérifiée par le rapport des $DO^{260\text{ nm}} / DO^{280\text{ nm}}$ qui doit être compris entre 1,7 et 2,2. Les ARN sont conservés à -80°C à une concentration de 250 ng/µl.

b) Amplification des ARNs

Nous avons utilisé deux techniques d'amplification des ARN.

✓ *Amplification des ARNm avec les kits Qiagen RT-PCR « One-step »*

L'amplification est réalisée en accord avec les recommandations du fournisseur. Les mélanges réactionnels se composent de 10 µl de tampon 5X concentré, (contenant du $MgCl_2$ à 12,5 mM), des dNTP à 400 µM, de 2 µl d'un mélange enzymatique (qiagen), de 10 µmol de chacune des amorces et de 0,25 µg d'extrait d'ARN totaux dans un volume final de 50 µl

d'eau sans RNase. Les séquences des amorces des gènes étudiés sont répertoriées dans le tableau 4 consultable dans les annexes (annexes 1 et 2).

Les réactions de RT-PCR sont réalisées dans un thermocycler *icycler* (BioRad) selon le programme suivant (tableau 1) :

Étape	Température	Durée	Nombre de cycles
Transcription inverse	50°C	30 minutes	1
PCR			
activation	95°C	15 minutes	1
dénaturation	94°C	30 secondes	30
appariement	58°C à 72°C	30 secondes	
extension	72°C	1 minute	
Extension finale	72°C	10 minutes	1

Tableau 1 : programme des RT-PCR en une étape.

✓ *Amplification des ARNm en deux étapes*

La première étape consiste à convertir les ARNm en ADN complémentaire. Pour cela, 1 µg d'ARNs total est dilué dans de l'eau sans RNase puis 2 µL de random primers sont ajoutés et le mélange est incubé 5 minutes à température ambiante avant d'être placé dans la glace. On ajoute ensuite 10 µL d'un mélange réactionnel contenant 3 µL d'eau sans RNase, 0,5 µL de dNTPs à 25 mM, 5µL de tampon 5X, 0,5 µL de RNase inhibiteur et 1 µL d'un mélange enzymatique contenant des ARN polymérases et des ADN polymérase. Les réactions de transcription inverse sont réalisées dans un thermocycler *icycler* (BioRad) (tableau 2).

La seconde étape consiste à amplifier les ADNc obtenus. Pour cela, 1 µL du produit d'amplification est ajouté à un mélange réactionnel contenant 5 µL de tampon 5X, 1,5 µL d'une solution de chlorure de magnésium à 25 mM, 1 µL de dNTPs à 5mM, 1,5 µL de chacune des amorces du gène d'intérêt à 10 µM, 0,125 µL de l'enzyme Taq polymérase et de

l'eau sans RNase qsp 24 μ L. Les réactions d'amplifications sont réalisées dans un thermocycler *icycler* (BioRad) (tableau 2).

Etapes	Températures	Durée	Nombre de cycles
Transcription inverse			
extension	37°C	60 minutes	1
inactivation de l'enzyme	70°C	10 minutes	1
PCR			
activation	95°C	2 minutes	1
dénaturation	95°C	30 secondes	30
appariement	58°C à 72°C	30 secondes	
extension	72°C	1 minute	
Extension finale	72°C	5 minutes	1

Tableau 2 : programme de RT-PCR en deux étapes.

VI. Immunomarquages sur coupes de tumeur ou sur cellules

1. Protocoles de marquages par immunofluorescence

a) Préparation des cellules

Les cellules sont soit ensemencées la veille de leur utilisation en Lab-Tek (Lab-Tek II, Nalge Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc) à la concentration de 10^4 cellules par puits, soit fixées dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 2 % pendant 15 minutes avant d'être resuspendues à une concentration de 10^5 cellules par mL en PBS 1X. 200 μ L de la suspension cellulaire ainsi préparée sont alors centrifugées à 300 rpm pendant 3 minutes afin de les fixer sur des lames Superfrost⁺. Les lames sont ensuite séchées pendant au moins 30 minutes à température ambiante puis conservées à -80°C.

b) Immunomarquages

Une étape préalable de fixation est nécessaire pour les cellules implantées en Lab-Teck, pour cela les cellules sont fixées 15 minutes avec une solution de PFA à 2% puis rincées avec du PBS 1X.

Dans le cas de marquages intracytoplasmiques ou nucléaires, une étape préalable de perméabilisation est réalisée par incubation des cellules avec une solution de PBS 1X / Triton X-100 à 0,2 % pendant 15 minutes à température ambiante.

Les sites antigéniques non spécifiques sont bloqués par incubation 30 minutes à température ambiante avec une solution de saturation de PBS 1X / BSA 5 % / Tween 20 0,1 %. Les cellules sont ensuite incubées 60 minutes à température ambiante avec l'anticorps primaire dilué au 1/100^{ème} dans une solution de PBS 1X / BSA 1 %, puis rincées 3 fois 5 minutes avec une solution de PBS 1X / Tween 20 0,1 %. Une dilution d'anticorps secondaire, spécifique de l'isotype de l'anticorps primaire, couplée à une molécule d'Alexa-488 ou -568 (Molecular Probes, Invitrogen) est alors ajoutée aux cellules durant 30 minutes à température ambiante à l'obscurité, puis 3 lavages en PBS 1X / Tween 20 0,1 % sont effectués. Les lames sont montées avec une lamelle fixée par du milieu de montage Prolong (Invitrogen) contenant du DAPI, un agent intercalant de l'ADN qui permet de visualiser les noyaux des cellules lorsqu'il est excité par un faisceau à 372 nm. Les lames sont observées par microscopie à épifluorescence (Nikon Eclipse E400).

2. Protocoles de marquages par immunohistologie

a) Fixation des tissus

✓ *Fixation en paraffine*

Les tissus sont prélevés puis plongés dans une solution de formol 4 % avant d'être déshydratés dans des bains d'alcool de titre volumique croissant, inclus en paraffine chaude (entre 54 et 56°C) puis refroidis à 4°C (tableau 3).

	Bains	Durée
Déshydratation	Alcool 70°	1 heure
	Alcool 80°	1 heure
	Alcool 95° I	1 heure
	Alcool 95° II	1 heure
	Alcool 100° I	2 heures
	Alcool 100° II	3 heures
	Alcool 100° III	3 heures
	Alcool 100° IV	3 heures
Éclaircissement	Xylène I	1 heure
	Xylène II	1 à 2 heures
Imprégnation à 58°C	Paraffine I	1 heure

Tableau 3 : cycle d'inclusion.

Les blocs de tissus ainsi obtenus sont conservés à température ambiante puis ensuite montés sur des porte-objets afin de réaliser des coupes de 5 µm d'épaisseur au moyen d'un microtome. L'étalement des coupes sur les lames SuperFrost se fait par chauffage et les lames sont ensuite séchées une nuit à 37°C.

Avant de réaliser le marquage, les coupes sont déparaffinées par des bains successifs de xylène (3 fois 3 minutes), puis réhydratées par des bains successifs de 2 minutes en solution alcoolique de titre volumique décroissant (100°, 95° puis 70°). Enfin les coupes sont plongées dans de l'eau distillée pendant 10 minutes.

En fonction de l'anticorps primaire utilisé pour le marquage immunohistologique, un démasquage des sites antigéniques peut être nécessaire. Les lames sont alors plongées dans un bain de tampon citrate à pH = 6 pendant 20 minutes à 96°C au bain marie. Elles sont ensuite refroidies pendant au moins 20 minutes à température ambiante avant d'être rincées dans des bains d'eau distillée.

✓ *Fixation par congélation*

Les tissus sont prélevés puis plongés dans une solution de formol 4% avant d'être plongés pendant 24h dans deux bains de solutions de concentrations croissantes de saccharose (15 % puis 30 %) afin d'éviter aux tissus de se fracturer. Les tissus sont ensuite directement inclus en OCT sur la platine d'un cryostat refroidit à -20°C puis les blocs sont conservés à -80°C.

Des coupes de 5 µm sont réalisées sur un cryotome refroidit à -20°C, déposées sur des lames SuperFrost, séchées une nuit à température ambiante puis conservées à -20°C ou -80°C.

Avant utilisations les lames sont rincées dans des bains d'eau distillée puis de PBS 1X afin d'éliminer le saccharose.

De même que pour les tissus inclus en paraffine un démasquage des sites antigéniques peut être nécessaire. L'inhibition des fonctions aldéhydes du formol est réalisée par incubation des lames avec une solution de chlorure d'ammonium (NH₄Cl) à 50 mM durant 30 minutes à température ambiante.

b) Principe des marquages immunohistochimiques

L'objectif des marquages immunologiques est d'identifier à l'aide d'anticorps spécifiques des composants tissulaires, des cellules, des constituants cellulaires ou des protéines. Pour atteindre cet objectif, deux méthodes peuvent être utilisées, directe et indirecte.

Dans le marquage direct, on utilise un anticorps spécifique de la cible à identifier. Cet anticorps est couplé à une enzyme qui va dégrader un substrat chromogène et permettre le dépôts d'un précipité coloré au lieu de réaction.

Dans le marquage indirect, on utilise un anticorps secondaire qui va se fixer de manière spécifique sur les fragments constants des chaînes d'immunoglobulines de l'anticorps primaire. C'est l'anticorps secondaire qui est couplé à une enzyme. Comme pour la méthode directe, la révélation se fait par dégradation d'un substrat chromogène et précipitation du produit de réaction coloré.

Il est possible d'augmenter la sensibilité de la réaction en couplant l'anticorps secondaire avec des molécules de biotine. Celles-ci vont alors être reconnues par un complexe streptavidine/enzyme ajouté lors d'une troisième étape. Cette technique en trois étapes permet d'amplifier le signal de marquage.

La peroxydase et la phosphatase alcaline sont les enzymes les plus fréquemment utilisées. Dans cette étude, nous avons utilisé des molécules couplées à la peroxydase que nous avons révélées par utilisation de l'AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) dont le produit de clivage est un précipité rouge.

c) Protocoles des marquages immunohistochimiques

Les coupes sont rincées par des bains en PBS 1X puis cerclées à l'aide d'un stylo hydrophobe (Dako Pen, Dako, Trappes, France). Elles sont incubées 20 minutes à température ambiante dans une solution d'eau oxygénée (H_2O_2) à 3 % afin d'inhiber les peroxidases endogènes présentes dans les tissus. Les sites antigéniques non spécifiques sont bloqués par incubation en chambre humide 30 minutes à température ambiante avec une solution de saturation de PBS 1X / BSA 5 % / Tween 20 0,1 % additionnée de 10 % de sérum de l'isotype de l'anticorps secondaire. Les coupes sont ensuite incubées en chambre humide durant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de PBS 1X / BSA 1 %. Après trois rinçages de 5 minutes dans une solution de PBS 1X / Tween 20 0,1 % (PBST), une dilution au 1/200^{ème} en PBS 1X / BSA 1 % / Sérum de rats normal 10 % (SRN) d'anticorps secondaires spécifiques de l'isotype de l'anticorps primaire et couplés à des molécules de biotines est ajoutée sur les coupes durant 60 minutes à température ambiante en chambre humide. Après trois rinçages en PBST, une dilution au 1/1000^{ème} en PBS 1X / BSA 1 % / SRN 10 % de molécules de streptavidine couplées à des peroxydases est ajoutée sur les coupes durant 45 minutes à température ambiante en chambre humide. Après trois rinçages en PBST les coupes sont incubées avec une solution d'AEC (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA). Le développement de la coloration est contrôlé par observation des coupes au microscope par comparaison avec des coupes contrôles où l'anticorps primaire est remplacé par un anticorps non relevant de même isotype. La réaction de coloration est stoppée en immergeant les coupes dans un bain d'eau distillée. Les coupes sont contre-colorées par utilisation d'une solution d'hématoxyline de Mayer qui colore les noyaux des cellules en violet, puis lavées à l'eau courante et montées en milieu aqueux.

Un tableau récapitulant les différents anticorps primaires utilisés est consultable dans les annexes (annexe 3).

3. Protocoles des marquages par immunohistofluorescence

Les marquages immunohistofluorescents sont réalisés suivant le même protocole que pour les marquages immunohistochimiques. Les complexes streptavidines / enzymes sont remplacés par des complexes streptavidines / alexa-488 ou -568 (Molecular Probes, Invitrogen). Les lames sont montées avec une lamelle fixée par du milieu de montage Prolong (Invitrogen) contenant du DAPI, un agent intercalant de l'ADN qui permet de visualiser les noyaux des cellules lorsqu'il est excité par un faisceau à 372 nm. Les lames sont observées par microscopie à épifluorescence (Nikon Eclipse E400).

4. Protocoles de double marquages immunohistologiques

Les doubles marquages sont effectués de manière séquentielle. La totalité du marquage avec le premier anticorps primaire est réalisé, les sites antigéniques non spécifiques sont bloqués une seconde fois par incubation en chambre humide 30 minutes à température ambiante avec une solution de saturation de PBS 1X / BSA 5 % / Tween 20 0,1 % additionnée de 10 % de sérum de l'isotype du second anticorps secondaire, le second marquage avec le deuxième anticorps primaire est ensuite réalisé.

5. Marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling)

a) Principe

Les cellules en apoptose sont caractérisées par la condensation et la fragmentation de la chromatine. L'ADN est dégradé de façon internucléosomale, en nombreux fragments de 150-200 pb. Les extrémités 3'-OH de ces fragments sont libres. La Terminal Deoxynucleotidyl Transférase (TdT) incorpore à ces extrémités des nucléotides conjugués à la digoxigénine. Les fragments ainsi marqués sont révélés par un complexe digoxigénine/peroxydase en présence d'un substrat spécifique.

b) Protocole

Le protocole suivi a été celui du fournisseur. (ApopTag Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit, Millipore). Brièvement, les lames sont incubées 15 minutes à 37°C puis 15 minutes à température ambiante dans une solution de protéinase K à 20 µg/mL (Promega). Cette enzyme dégrade les histones autour desquelles s'enroule l'ADN et qui limitent l'accès de la TdT ou de la DNase. Les lames sont ensuite rincées dans de l'eau distillée. Les peroxydases endogènes sont inhibées pendant 5 minutes avec de l'H₂O₂ à 1,5 % dans du PBS, puis rincées à l'eau distillée.

Un contrôle positif est constitué par incubation des lames 10 minutes à 37°C en présence de DNase (1U/mL). La DNase dégrade l'ADN des cellules, générant de nombreux fragments possédant des extrémités 3'-OH libres qui peuvent être marqués par la TdT.

Après incubation de 10 minutes avec un tampon d'équilibration, les lames sont incubées 1 heure à 37°C en chambre humide en présence de l'enzyme TdT dilué dans son tampon. Un contrôle négatif est réalisé en incubant les lames sans enzyme.

L'action de l'enzyme est ensuite stoppée par incubation des lames 10 minutes dans un tampon spécifique. Après rinçage au PBS, les lames sont incubées 30 minutes avec un complexe digoxigénine/péroxydase et les fragments marqués sont révélés à l'AEC. La progression de la coloration est contrôlée au microscope et la réaction est stoppée en plongeant les lames dans un bain d'eau. Après contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer, les lames sont lavées à l'eau courante et montées en milieu aqueux.

6. Marquage des cellules sénescents par le DDAOG

Les cellules sénescents présentent une morphologie caractéristique avec une augmentation très importante de leur taille due notamment à l'augmentation du nombre et du volume des vacuoles cytoplasmiques. La mise en évidence de l'augmentation de l'activité d'une enzyme lysosomale, la Senescent-Associated-β-Galactosidase (SA-β-Gal), contenue dans ces vacuoles permet l'identification des cellules sénescents. L'activité de la SA-β-Gal lysosomale peut être mise en évidence à l'aide d'un composé fluorescent, le DDAOG. Le 9H-(1,3-dichloro-9,9-diméthylacridin-2-one-7-yl) β-D-galactopyranoside (DDAOG) est clivé par la SA-β-Gal en 7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-diméthylacridin-2-one) (DDAO). Le clivage

du DDAOG en DDAO induit un décalage du signal fluorescent vers les longueurs d'onde rouge.

a) Marquage de coupes de tissus fixés par congélation

Les échantillons sont fixés pendant 15 minutes avec une solution de PFA 2 % , incubés à 37°C sans CO₂ pendant 60 minutes avec la solution de DDAOG à 10 µM puis rincés dans un bain de PBS 1X. Les lames sont montées avec une lamelle fixée par du milieu de montage Prolong (Invitrogen) contenant du DAPI, un agent intercalant de l'ADN qui permet de visualiser les noyaux des cellules lorsqu'il est excité par un faisceau à 372 nm. Les lames sont observées par microscopie à épifluorescence (Nikon Eclipse E400).

b) Marquage de cellules

Les cellules sont fixées pendant 15 minutes avec une solution de PFA 2 % , incubées à 37°C sans CO₂ pendant 60 minutes avec la solution de DDAOG à 10 µM puis rincées dans un bain de PBS 1X. Les cellules sont ensuite décrochées par incubation avec de la trypsine, centrifugées à 500 g pendant 5 minutes et resuspendues dans 500 µL de PBS 1X. L'analyse du clivage du DDAOG par les cellules sénescents est réalisée par cytométrie en flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

VII. Protocoles de colorations

1. Coloration Hémalum Eosine Safran (HES)

Cette coloration est utilisée classiquement pour déterminer la morphologie des tissus étudiés. En effet l'hémalum colore les acides nucléiques et les éléments basophiles en bleu-violet, l'éosine colore le cytoplasme en rouge-rosé et le safran les fibres conjonctives extracellulaires en jaune-orangé.

Après déparaffinage les coupes sont plongées dans un bain d'hémalum durant 3 à 5 minutes, rincées à l'eau courante, puis bleuies dans une solution d'eau lithinée, de nouveau rincées à l'eau courante, colorées dans une solution aqueuse d'éosine à 1 % durant 5 à 7

minutes, rincées rapidement à l'eau courante, à l'éthanol 70°, 95° puis absolu. Les coupes sont ensuite colorées dans une solution alcoolique de safran, déshydratées par des bains successifs d'alcool absolu et de xylène avant d'être montées avec un milieu de montage non aqueux et conservées à température ambiante en atmosphère sèche.

2. Coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG)

Cette coloration est utilisée classiquement en hématologie pour discriminer les différents types cellulaires présents dans un frottis sanguins. Elle repose sur l'action de deux colorants neutres, le May-Grünwald constitué d'un colorant acide, l'éosine, et d'un colorant basique, le bleu de méthylène, et le Giemsa constitué d'un colorant acide, l'éosine, et d'un colorant basique, l'azur de méthylène. Les constituants cellulaires acides fixent les colorants basiques et sont qualifiés d'éléments basophiles (les acides nucléiques par exemple). A l'opposé, les constituants cellulaires basiques fixent les colorants acides et sont qualifiés d'éléments acidophiles (l'hémoglobine par exemple). Enfin, les constituants cellulaires fixant les deux types de colorants sont dit neutrophiles. Ainsi, les noyaux sont colorés en bleu-violet, les granulations des granulocytes basophiles en bleu, les hématies en beige-rosé, les granulations des granulocytes éosinophiles en orange, les granulations des granulocytes neutrophiles en violet.

a) Coloration des frottis sanguins

Après séchage les frottis sont plongés dans une solution pure de May-Grünwald pendant 3 minutes puis dans une solution de May-Grünwald diluée au demi dans un tampon phosphate pH = 6,8 pendant 3 minutes. Sans rinçage les frottis sont ensuite plongés pendant 20 minutes dans une solution de Giemsa dilué au 10^{ème} dans le même tampon puis lavés rapidement par passage sous l'eau courante. Ils sont ensuite séchés, déshydratés dans des bains successifs de xylène puis montés avec un milieu de montage non aqueux.

b) Coloration des tissus

Après déparaffinage les coupes sont plongées pendant 20 minutes à 37°C dans un bain de solution de May-Grünwald diluée au 5^{ème} dans de l'eau à pH = 7. Les coupes sont ensuite plongées directement pendant 20 minutes à 37°C dans un bain de solution Giemsa diluée au 10^{ème} dans de l'eau à pH = 7. Elles sont ensuite refroidies à température ambiante, rincées à l'eau tamponnée, différenciées par passage rapide dans de l'eau acétifiée puis rincées de nouveau à l'eau tamponnée avant d'être déshydratées par des bains successifs dans un mélange volume à volume d'alcool absolu et d'acétone puis de xylène et montées avec un milieu de montage non aqueux.

3. Coloration de la SA-β-Galactosidase

Les cellules sénescents peuvent être mises en évidence à l'aide d'une solution de X-Gal. La SA-β-Gal lysosomale clive le substrat chromogène X-Gal dilué dans un tampon à pH = 6 et on observe le dépôts d'un précipité bleu au site de clivage. La coloration peut être réalisée sur des cellules ainsi que sur des coupes de tissus fixés par congélation. Les échantillons sont fixés pendant 15 minutes avec une solution de PFA 2 % , incubés à 37°C sans CO₂ pendant le temps nécessaire avec la solution chromogène de X-Gal, rincés dans un bain de PBS 1X puis les noyaux des cellules sont colorés par un bain dans une solution de Nuclear Fast Red (NFR). Après rinçage, les échantillons sont déshydratés par des bains successifs dans des solutions alcooliques de titre volumiques croissant puis de xylène et montés avec un milieu de montage non aqueux.

La solution chromogène de X-Gal doit être préparée extemporanément et est composée de 1 mg.mL⁻¹ de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranoside) dissout dans une solution à pH = 6 de tampon d'acide citrique à 40 mM additionnée d'une solution de potassium ferrocyanide 5 mM, d'une solution de potassium ferricyanide 5 mM, d'une solution de chlorure de sodium 150 mM et d'une solution de chlorure de magnésium 2 mM.

VIII. Statistiques :

La signification statistique de l'effet de l'immunothérapie a été déterminée par un test de Kruskal et Wallis pour la répartition des carcinomatoses. Celle de l'efficacité du traitement sur la survie des rats a été déterminée par un test « Log rank ».

Les données expérimentales *in vitro* sont exprimées \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel StatView software. Le test de Mann Whitney a été utilisé pour comparer les données entre deux groupes de traitements. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives à: *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; and ***, $P \leq 0,005$.

Résultats

1^{ère} Partie

Rôle des neutrophiles et du granzyme B dans l'efficacité antitumorale d'une immunothérapie par un lipide A

I. Le lipide A guérit les rats porteurs de petites carcinomatoses péritonéales d'origine colique

1. Survie des rats BD IX porteurs de petites carcinomatoses péritonéales

Les rats BD IX reçoivent par injection i.p. 10^6 cellules cancéreuses coliques syngéniques PROb en phase exponentielle de croissance. Les animaux vont développer des carcinomatoses péritonéales qui vont envahir progressivement toute la cavité péritonéale et induire la production d'ascite hémorragique. Le traitement commence 14 jours (J14) après l'injection des cellules tumorales et consiste en 15 injections i.v. de lipide A à 1 mg.kg^{-1} au rythme de trois injections par semaine durant 5 semaines consécutives. Les animaux contrôles reçoivent des injections i.v. de sérum physiologique (figure 29). Des expériences préliminaires ont montré que les rats sont porteurs de nombreux nodules de 10 à 50 mm au début du traitement.

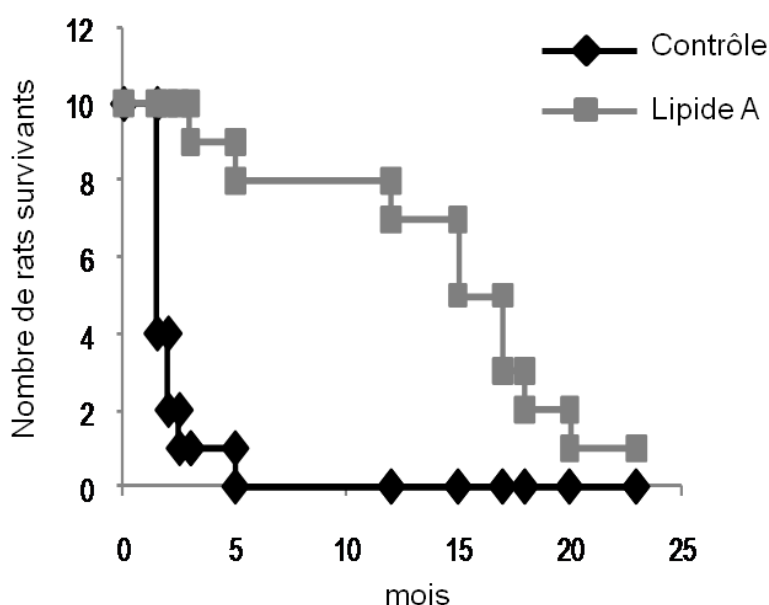


Figure 29 : courbes de survie de rats porteurs de tumeurs coliques traités ou non par le lipide A.

Tous les rats du groupe contrôle meurent dans les 12 semaines après l'injection des cellules tumorales. L'autopsie des animaux montre un envahissement de la totalité de la cavité péritonéale par des masses tumorales de plusieurs cm^3 ainsi qu'une production très importante d'ascite hémorragique.

Le traitement par le lipide A guérit 95% des rats porteurs de tumeurs. L'autopsie des animaux lors de leur mort atteste de l'absence de nodules tumoraux et d'ascite hémorragique dans la cavité péritonéale. Ces résultats sont en accords avec les données déjà publiées par le laboratoire (Onier et al., 1999a).

2. Le traitement par le lipide A induit la diminution de la quantité de cellules tumorales

Afin de confirmer au niveau cellulaire la disparition des cellules tumorales après traitement des rats par le lipide A, nous avons réalisé des marquages immunohistofluorescents des cellules tumorales par un anticorps dirigés contre les cytokératines, filaments intermédiaires spécifiquement exprimés dans les tissus épithéliaux (figure 30).

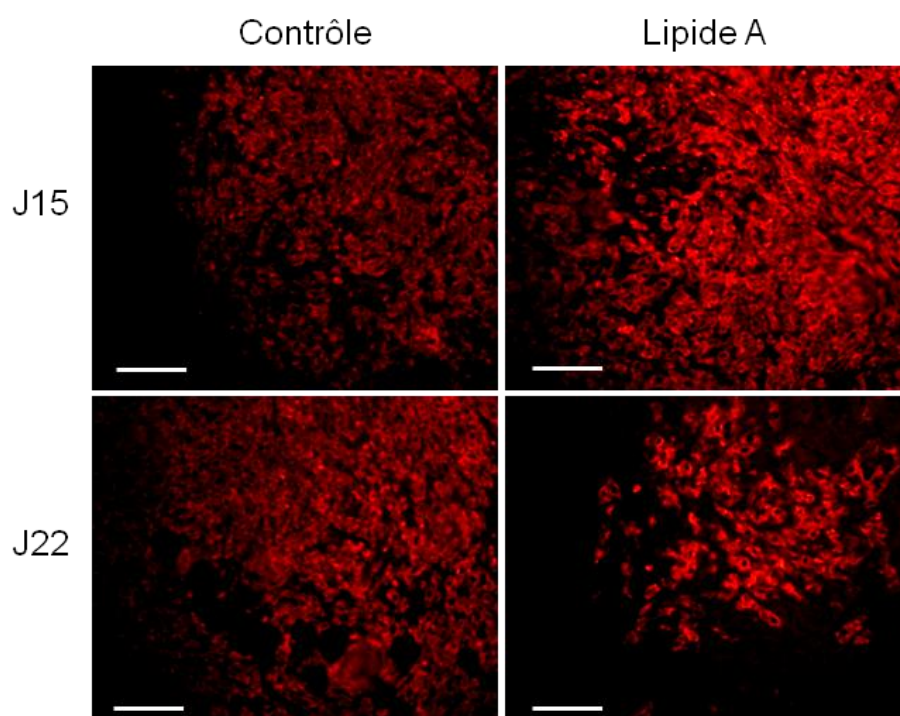


Figure 30 : marquage immunohistofluorescent des cellules tumorales au sein des nodules de rats traités ou non par le lipide A. Les nodules sont prélevés 24h après les première et quatrième injections de lipide A ou de sérum physiologique (J15 et J22), fixés et inclus en OCT. Des coupes de 5 μm ont été préparées et un marquage avec un anticorps anti-cytokératine (rouge) a été réalisé. Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

Nous observons une diminution très nette dès J22 (24h après la quatrième injection de lipide A) du nombre de cellules tumorales dans les nodules prélevés chez les rats traités par le lipide A. Le traitement par le lipide A induit donc bien la diminution du nombre de cellules tumorales au sein des tumeurs.

3. Augmentation du recrutement de cellules immunitaires périphériques

Nous avons réalisé une coloration hémalum-éosine-safran (HES) de coupes de nodules tumoraux afin de déterminer la morphologie des tumeurs et les modifications induites par le traitement par le lipide A.

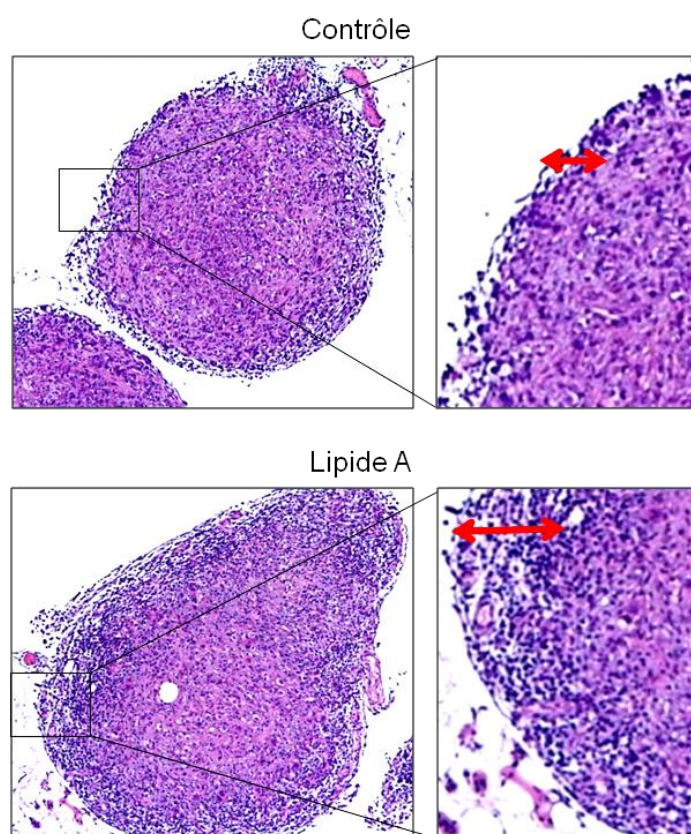


Figure 31 : coloration HES de coupes histologiques des tumeurs de rats traités ou non par le lipide A. Les nodules sont prélevés 24h après la seconde injection de lipide A ou de sérum physiologique (J17), fixés et inclus en paraffine. Les flèches rouges permettent de visualiser l'épaisseur de l'anneau de cellules immunitaire entourant les nodules tumoraux. Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

Les nodules tumoraux sont constitués d'un cœur de cellules tumorales entouré par un anneau périphérique de cellules immunitaires (figure 30). D'autre part nous avons mis en évidence un épaississement de l'anneau de cellules immunitaires lorsque les rats sont traités par le lipide A.

II. Le lipide A induit le recrutement, l'infiltration et l'activation de neutrophiles au sein des tumeurs

1. Augmentation de la concentration en chimioattractants des neutrophiles dans les tumeurs des rats traités par le lipide A

L'augmentation du nombre de cellules immunitaires en périphérie des tumeurs des rats traités par le lipide A nous a amené à rechercher les modifications induites par le lipide A sur le microenvironnement tumoral. Pour cela nous avons hybridé une membrane de « cytokine antibody arrays » avec des lysats de tumeurs prélevées chez des rats traités ou non par le lipide A (figure 32 A).

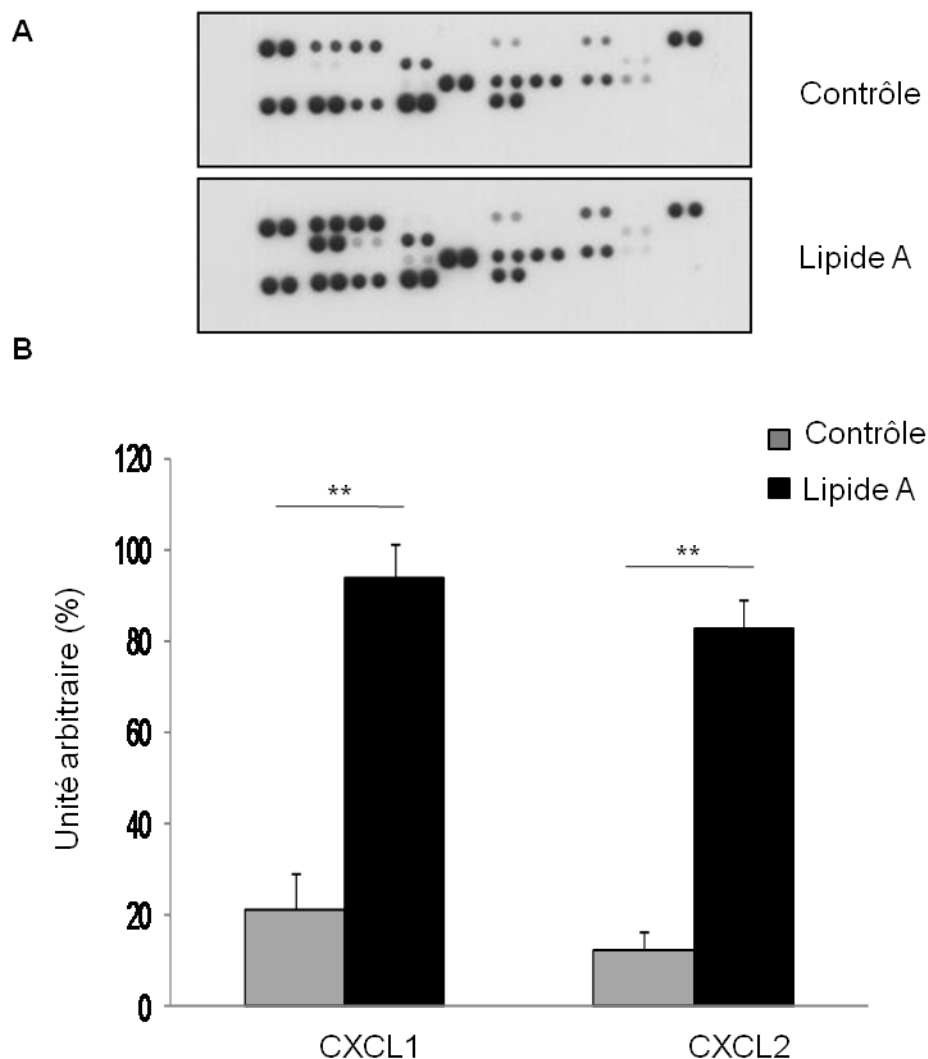


Figure 32 : variations de la quantité des chimiokines CXCL1 et CXCL2 mesurées par « cytokine antibody arrays ». Les tumeurs de rats contrôles (gris) ou traités par le lipide A (noir) ont été prélevées, lysées et leur contenu en cytokines et chimiokines a été analysé. (A) Immunorévélation des membranes de « cytokine antibody arrays » (B) La quantité relative de CXCL1 et CXCL2 a été déterminée en utilisant le logiciel ImageJ et les résultats ont été exprimés en pourcentage par comparaison avec un contrôle interne (100 %). ** $p < 0,01$, test statistique de Mann Whitney. Figure représentative de 3 expériences indépendantes.

Les deux chimiokines dont la concentration est la plus fortement augmentée par le traitement par le lipide A sont CXCL1 et CXCL2. Cette augmentation est mesurée dès J15, soit 24h après la première injection de lipide A, et est maximum à J17, soit 24h après la deuxième injection de lipide A (figure 32 B).

Afin de confirmer les résultats obtenus par cytokine arrays, nous avons analysé par RT-PCR les modulations de l'expression des gènes de *cxcl1* et *cxcl2* au sein des tumeurs prélevées à J17 chez des rats traités ou non par le lipide A (figure 33).

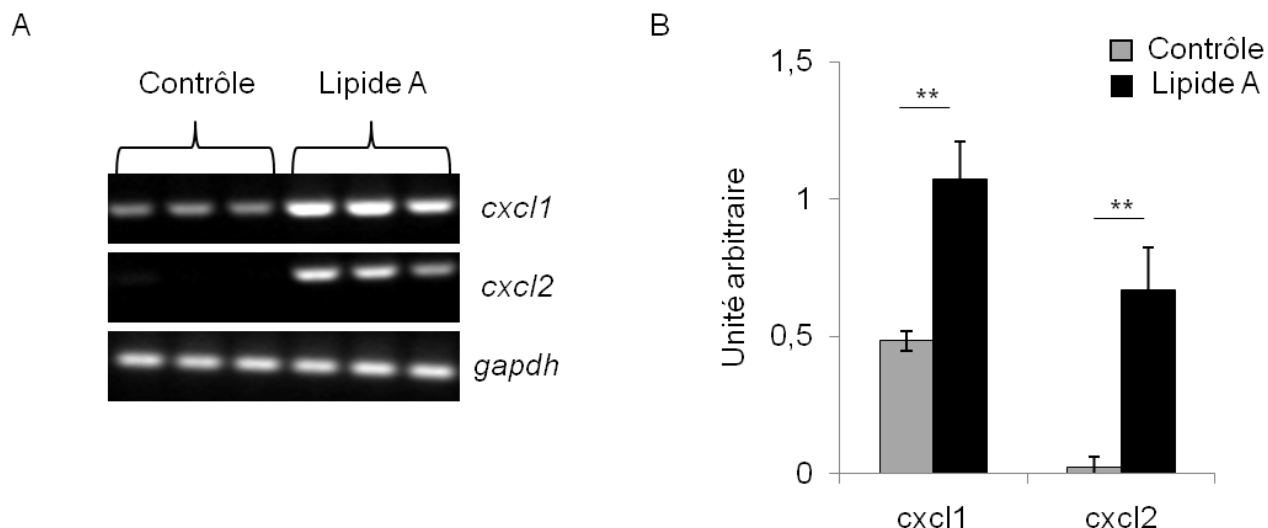


Figure 33 : variation de l'expression des gènes des chimiokines *cxcl1* et *cxcl2* dans les tumeurs de rats traités ou non par le lipide A. Les tumeurs ont été prélevées 6h après la deuxième injection de lipide A ou de sérum physiologique (J17) et les ARN totaux ont été extraits. (A) Expression des gènes de *cxcl1* et *cxcl2* par RT-PCR comparée à l'expression du gène de la *gapdh* (figure représentative de 3 expériences indépendantes) (B) Analyse par densitométrie, représentative de 3 RT-PCR indépendantes, des différences d'expression des gènes *cxcl1* et *cxcl2* par rapport à l'expression du gène de la *gapdh* (ImageJ). ** $p < 0,01$, test statistique de Mann Whitney.

De manière similaire à ce que nous avons obtenu au niveau protéique (figure 32), nous avons mis en évidence une forte augmentation de l'expression des gènes des chimiokines *cxcl1* et *cxcl2* dans les tumeurs des rats traités par le lipide A (figure 33).

2. Augmentation du recrutement des neutrophiles dans les tumeurs des rats traités par le lipide A

Les chimiokines CXCL1 et CXCL2 sont des chimioattractants bien connus des polynucléaires neutrophiles, elles permettent leur recrutement au niveau des sites inflammatoires ainsi que leur activation.

Nous avons donc recherché si le traitement par le lipide A induisait le recrutement de neutrophiles au sein des tumeurs. Pour cela nous avons réalisé des marquages immunohistofluorescents sur des coupes de tumeurs prélevées à J17 chez des rats traités ou non par le lipide A.

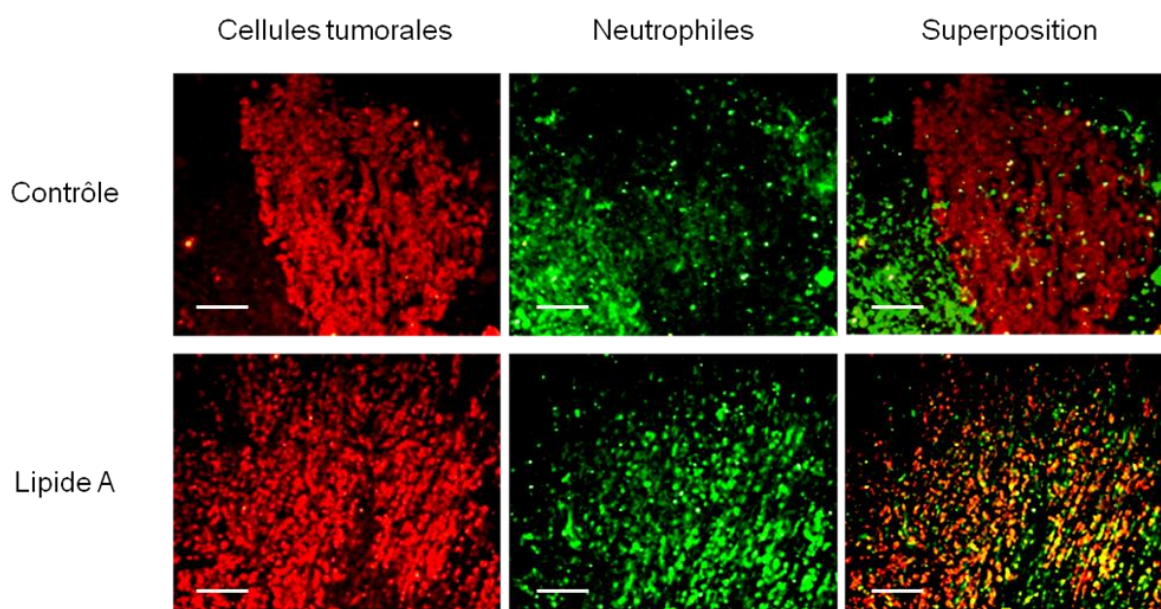


Figure 34 : marquage immunohistofluorescent des neutrophiles (vert) et des cellules tumorales (rouge) au sein de tumeurs de rats traités ou non par le lipide A. Les tumeurs ont été prélevées 24h après la deuxième injection de lipide A ou de sérum physiologique (J17), fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et des doubles marquages immunohistofluorescents ont permis de mettre en évidence les cellules tumorales à l'aide d'un anticorps anti-cytokératine (rouge) et les neutrophiles à l'aide d'un anticorps anti-HIS48 (vert). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Le lipide A induit un recrutement important des neutrophiles ainsi que leur infiltration au sein des tumeurs des rats traités (figure 34). En effet, alors que chez les rats contrôles, les neutrophiles restent en périphérie des tumeurs, dans les tumeurs des rats traités par le lipide A, les neutrophiles infiltrent les nodules tumoraux et viennent au contact des cellules tumorales.

Afin d'évaluer l'importance du recrutement des neutrophiles dans les tumeurs des rats traités par le lipide A, nous avons réalisé un comptage de ces cellules au sein des tumeurs (figure 35).

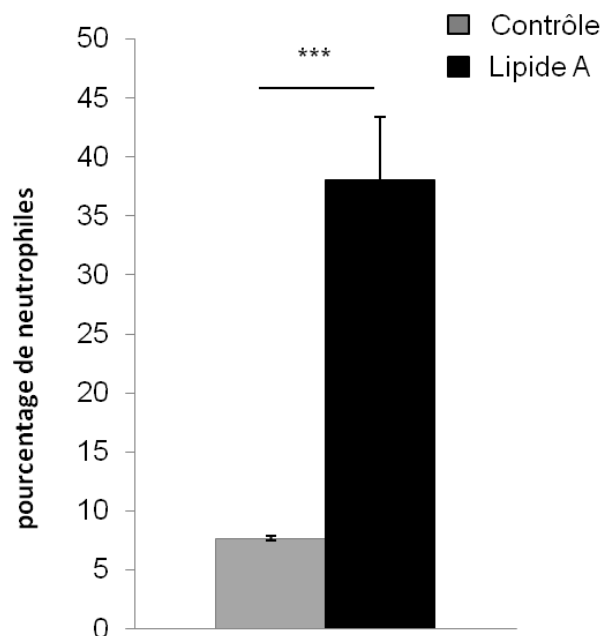


Figure 35 : proportion de neutrophiles au sein des tumeurs de rats traités ou non par le lipide A. Le nombre de neutrophiles marqués infiltrants les tumeurs a été compté sur 3 champs différents dans 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupe. *** $p < 0,005$, test statistique de Mann Whitney.

Il existe très peu d'anticorps spécifiques des neutrophiles de rats dans le commerce et utilisable pour effectuer des marquages immunohistologiques, c'est pourquoi nous avons utilisé l'anticorps HIS48 qui n'est pas un anticorps spécifique des neutrophiles mais des granulocytes. Nous avons donc réalisé une coloration de May-Grünwald Giemsa afin de confirmer que les granulocytes recrutés au sein des tumeurs des rats traités par le lipide A sont bien des neutrophiles.

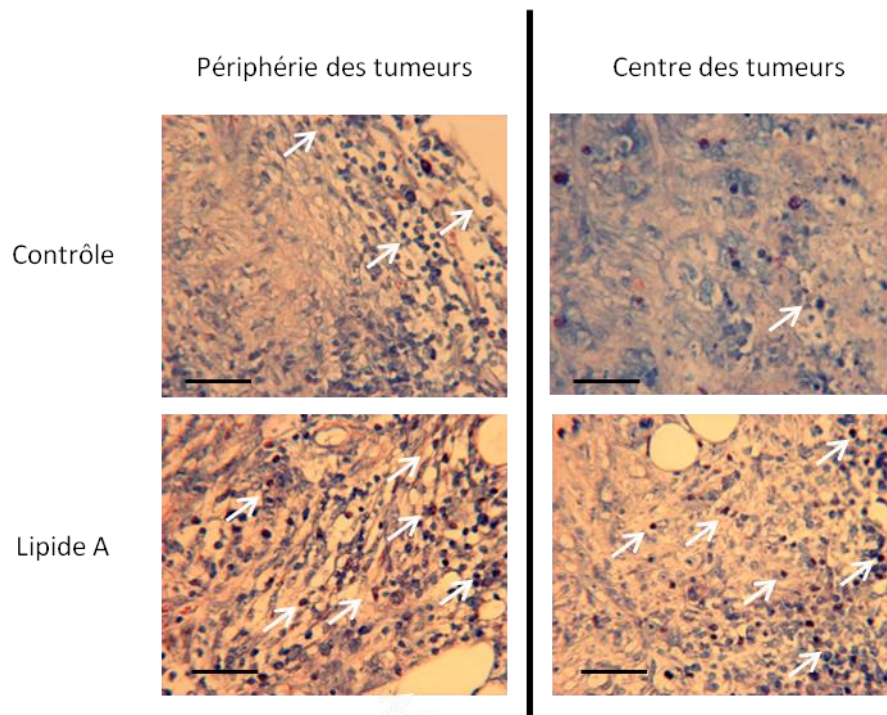


Figure 36 : coloration de May-Grünwald Giemsa de coupes de tumeurs de rats traités ou non par le lipide A. Les tumeurs ont été prélevées 24h après la deuxième injection de lipide A ou de sérum physiologique (J17), fixées et incluses en paraffine. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et les neutrophiles ont été mis en évidence par une coloration de MGG. Les neutrophiles sont colorés en violet et présentent un noyau polylobé (flèches blanches). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

De manière similaire à ce que nous avons observé à la figure 34, les neutrophiles sont présent uniquement à la périphérie des tumeurs des rats contrôles alors qu'ils sont présents en nombre plus important tant à la périphérie qu'au centre des nodules tumoraux lorsque les rats sont traités par le lipide A (figure 36).

Afin de confirmer l'augmentation du recrutement des neutrophiles observée par marquages immunohistofluorescents et coloration MGG, nous avons évalué la présence des neutrophiles au sein des tumeurs par RT-PCR. Pour cela nous avons déterminé les niveaux d'expression de deux gènes spécifiquement exprimés par les neutrophiles, *ncf1* et *ncf2*.

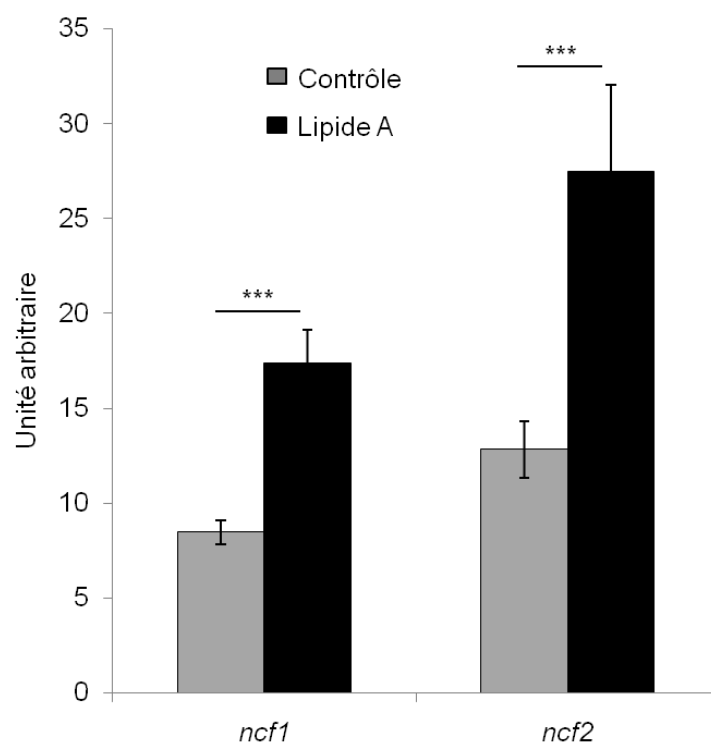


Figure 37 : analyse des niveaux d'expression des gènes *ncf1* et *ncf2* spécifiques des neutrophiles. Les tumeurs ont été prélevées 6h après la deuxième injection de lipide A ou de sérum physiologique (J17) et les ARN totaux ont été extraits. Analyse par densitométrie, représentative de 3 RT-PCR indépendantes, des différences d'expression des gènes *ncf1* et *ncf2* par rapport à l'expression de la *gapdh* (ImageJ). *** $p < 0,005$, test statistique de Mann Whitney. Figure représentative de 3 expériences indépendantes.

Nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'expression des gènes *ncf1* et *ncf2* au sein des tumeurs des rats traités par le lipide A (figure 37). Ces résultats confirment que le traitement par le lipide A induit le recrutement des neutrophiles au sein des tumeurs.

3. Activation des neutrophiles dans les tumeurs des rats traités par le lipide A

Actuellement, deux phénotypes différents ont été décrits concernant les neutrophiles intratumoraux (Fridlender et al., 2009). Ainsi les neutrophiles peuvent être soit pro-tumorigènes, on parle alors de neutrophiles de type N2, soit anti-tumoraux ou de type N1. Ces deux populations de neutrophiles se différencient par le niveau d'expression de deux enzymes, l'arginase 1 et la NOS inductible (iNOS). Ainsi, les neutrophiles N2 expriment fortement l'arginase 1 et n'expriment pas l'iNOS ($\text{Arg1}^{\text{high}}$, iNOS^-) alors que les neutrophiles N1 expriment faiblement l'arginase 1 et fortement l'iNOS (Arg1^{low} , $\text{iNOS}^{\text{high}}$). Nous avons donc réalisé des doubles marquages immunohistofluorescents afin de déterminer le type de neutrophile qui infiltre les tumeurs après traitement des rats par le lipide A.

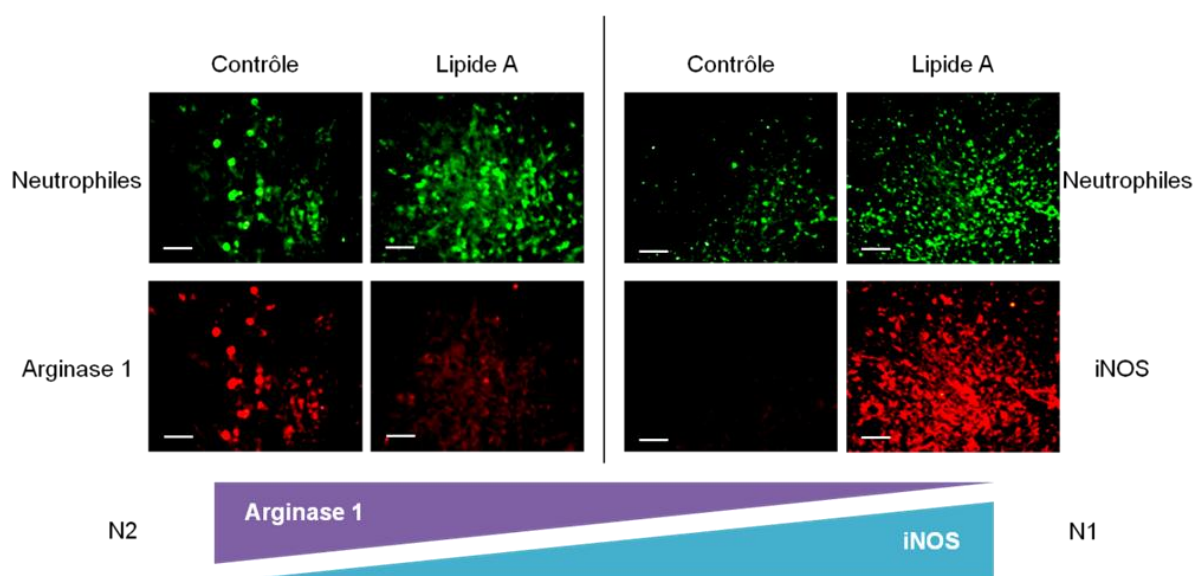


Figure 38 : marquages de l'arginase 1 et de l'iNOS exprimées par les neutrophiles dans les tumeurs de rats traités ou non pas le lipide A. Les tumeurs ont été prélevées 24h après la deuxième injection de lipide A ou de sérum physiologique (J17), fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μm ont été réalisées et des doubles marquages immunohistofluorescents ont permis de mettre en évidence les neutrophiles à l'aide d'un anticorps anti-HIS48 (vert) et l'arginase ou l'iNOS (rouge). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Nous avons mis en évidence que dans les rats contrôles, les neutrophiles intratumoraux sont de type N2 pro-tumorigènes ($\text{Arg1}^{\text{high}}$, iNOS^-) alors que lorsque les rats sont traités par le lipide A, les neutrophiles infiltrants les tumeurs sont de type N1 anti-tumoraux (Arg1^{low} , $\text{iNOS}^{\text{high}}$) (figure 38).

III. Le lipide A induit la mort des cellules tumorales à proximité des neutrophiles

1. Mise en évidence de la mort par apoptose des cellules tumorales chez les rats traités par le lipide A

Nous avons montré précédemment que le traitement par le lipide A induit la diminution du nombre de cellules tumorales dans les tumeurs (figure 30). Nous avons voulu savoir si cette diminution est due, au moins en partie, à la mort des cellules tumorales par apoptose. Pour cela, nous avons recherché la présence de cellules tumorales apoptotiques dans les tumeurs des rats traités par le lipide A.

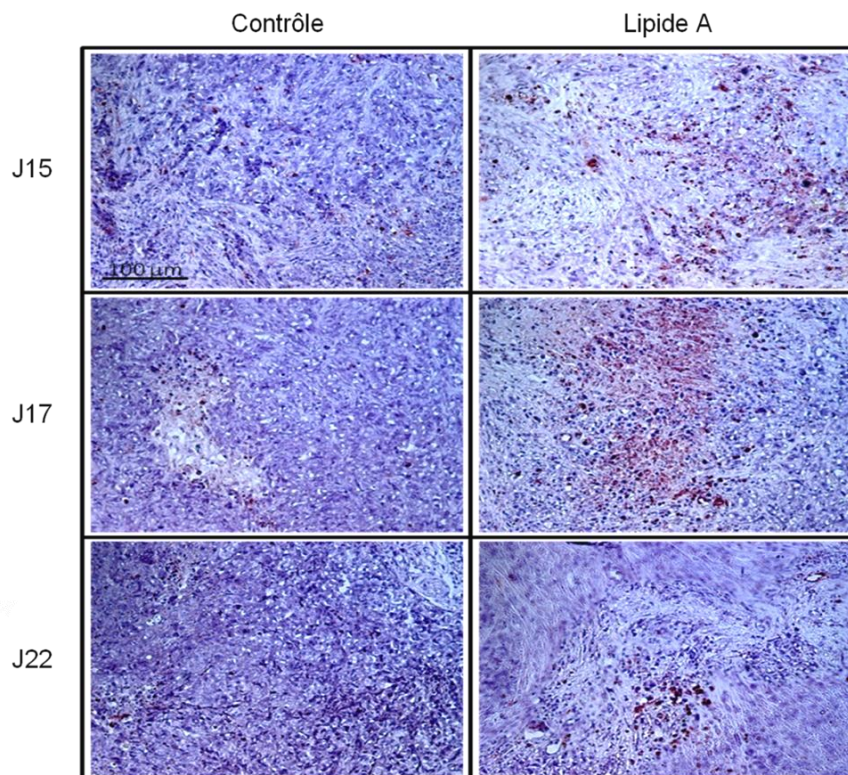


Figure 39 : marquage T.U.N.E.L. réalisé sur des coupes de tumeurs de rats traités ou non par le lipide A. Les tumeurs ont été prélevées 24h après les première (J15), deuxième (J17) et quatrième (J22) injections de lipide A ou de sérum physiologique, fixées et incluses en paraffine. Des coupes de 5 µm ont été réalisées et les cellules apoptotiques (colorées en marron/rouge) ont été mises en évidence par la méthode T.U.N.E.L. Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Quelques cellules apoptotiques sont observées de manière sporadique dans les tumeurs de rats contrôles alors que de nombreuses cellules apoptotiques sont mises en évidence au centre des tumeurs des rats traités par le lipide A et cela dès J15, soit 24h après la première injection de lipide A (figure 39).

Afin de déterminer si les cellules apoptotiques identifiées dans les tumeurs des rats traités par le lipide A sont des cellules tumorales nous avons réalisé un double marquage immunohistofluorescent des cellules tumorales et de la caspase 3 clivée. La caspase 3 est une protéine effectrice de l'apoptose activée par clivage et impliquée dans les voies de l'apoptose tant intrinsèque qu'extrinsèque.

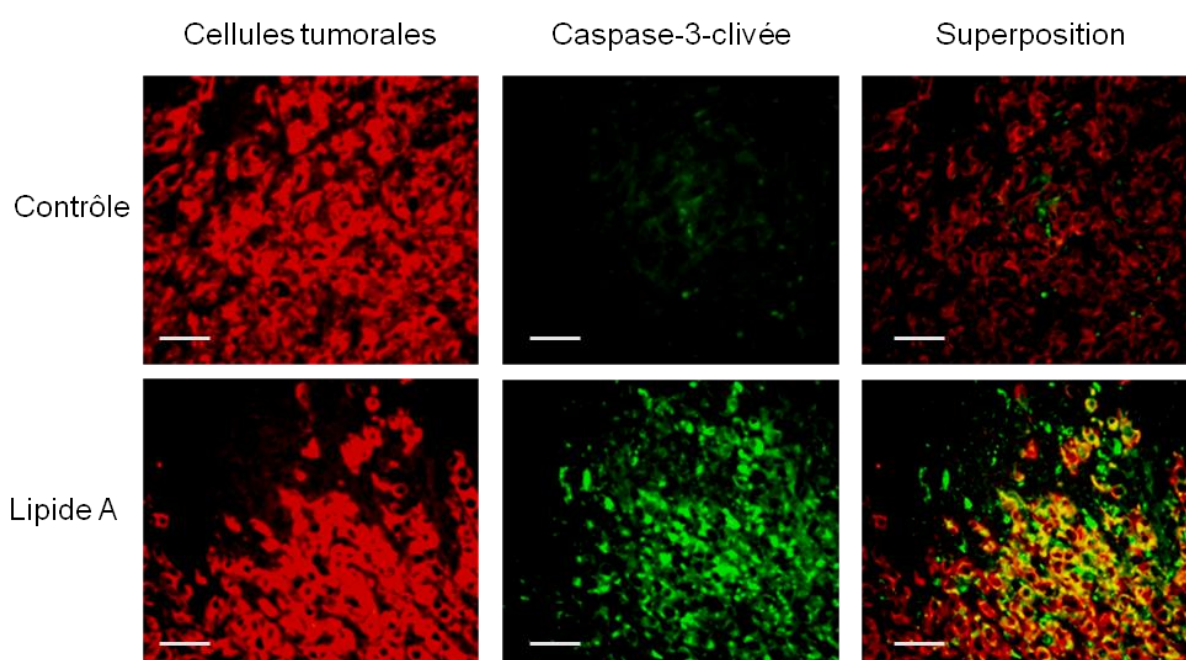


Figure 40 : marquage des cellules tumorales et de la caspase 3 clivée dans les tumeurs de rats traités ou non par le lipide A. Les tumeurs ont été prélevées 24h après la deuxième injection de lipide A ou de sérum physiologique (J17), fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et des doubles marquages immunohistofluorescents ont permis de mettre en évidence les cellules tumorales à l'aide d'un anticorps anti-cytokératines (rouge) et d'un anticorps anti-caspase 3 clivée (vert). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Très peu de cellules tumorales en apoptose ont été mises en évidence dans les tumeurs des rats contrôles alors que de très nombreuses cellules tumorales sont également marquées par la caspase 3 clivée dans les tumeurs des rats traités par le lipide A (figure 40). Ces résultats sont en accords avec des travaux antérieurs (Larmonier et al., 2004) et confirment que la

disparition des cellules tumorales observée dans les nodules des rats traités par le lipide A est due à une mort par apoptose des cellules tumorales qui se produit dans les 24h suivant l'injection de lipide A.

2. Les cellules tumorales apoptotiques sont à proximité de neutrophiles chez les rats traités par le lipide A

Comme nous venons de le voir, lorsque les rats sont traités par le lipide A les neutrophiles sont recrutés en masse et infiltrent les tumeurs. De plus, nous avons également montré que ces neutrophiles sont de type N1 (antitumoral). Nous avons donc cherché si les neutrophiles étaient localisés à proximité des cellules tumorales apoptotiques. Nous avons réalisé un double marquage immunohistofluorescent et pour localiser les cellules tumorales en apoptose nous avons utilisé un anticorps dirigé contre un fragment de la cytokératine 18 (M30) qui est clivée par la caspase 3 activée dans les cellules en apoptose.

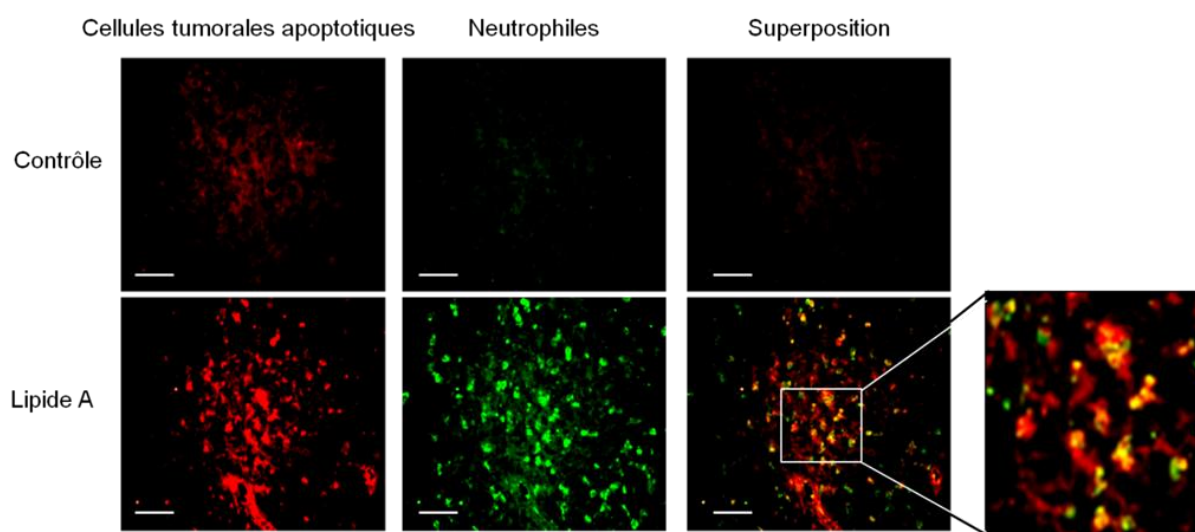


Figure 41 : marquage des cellules tumorales apoptotiques et des neutrophiles dans les tumeurs de rats traités ou non par le lipide A. Les tumeurs ont été prélevées 24h après la deuxième injection de lipide A ou de sérum physiologique (J17), fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et un double marquage immunohistofluorescent a mis en évidence les cellules tumorales apoptotiques à l'aide d'un anticorps anti-M30 (rouge) et les neutrophiles à l'aide d'un anticorps anti-HIS48 (vert). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 41, quasiment aucune cellule tumorale apoptotique et aucun neutrophile ne sont visibles dans les coupes de tumeurs de rats contrôles. A l'inverse, lorsque les rats sont traités par le lipide A, comme nous l'avons déjà montré aux figures 34 et 36, il y a un fort recrutement des neutrophiles dans les tumeurs. De plus, les neutrophiles sont présents à proximité des cellules tumorales apoptotiques.

3. Les neutrophiles sont impliqués dans l'efficacité antitumorale de le lipide A

Les neutrophiles de type N1 se trouvant à proximité des cellules tumorales apoptotiques, nous avons voulu tester leur implication dans l'effet antitumoral du lipide A. Ne disposant pas chez le rat d'outils pour répondre à cette question nous avons développé un modèle de tumeur colique sous-cutanée chez la souris Balb/C. Dans ce modèle, nous avons montré que le traitement des souris par le lipide A ralenti la croissance tumorale (figure 42).

Nous avons utilisé un antagoniste chimique de CXCR2 (le SB225002), qui est le récepteur des chimiokines CXCL1 et CXCL2. Le blocage de ce récepteur inhibe le recrutement des neutrophiles dans les tumeurs.

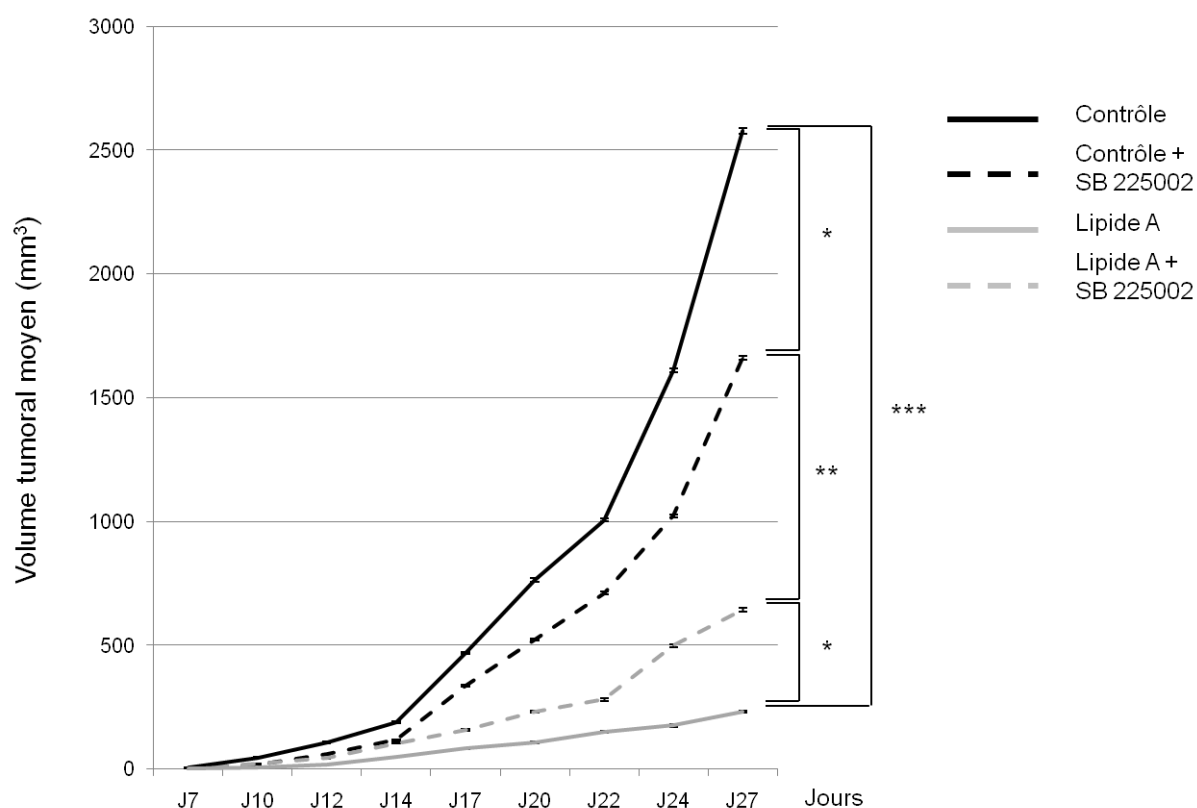


Figure 42 : courbes de croissance des tumeurs dans un modèle murin de tumeurs sous-cutanées d'origine colique. Les souris Balb/C reçoivent $5 \cdot 10^5$ cellules CT26 par injection sous-cutanée à J0. Les souris sont traitées ou non par 5 injections i.v. de lipide A (courbe grise) à 8 mg.kg^{-1} tous les 5 jours à partir de J3. L'inhibiteur de recrutement des neutrophiles SB 225002 est injecté en i.p. 24h avant l'injection de lipide A et le jour même à 4 mg.kg^{-1} . Les souris contrôles (courbe noire) reçoivent du sérum physiologique. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, test statistique de Mann Whitney.

Le traitement par le lipide A ralenti de manière très importante la progression des tumeurs, cependant, lorsque le recrutement des neutrophiles au sein des tumeurs est bloqué, le lipide A perd de son efficacité (figure 42).

Nous avons vérifié par un marquage immunohistochimique que le recrutement des neutrophiles au sein des tumeurs était correctement bloqué par les injections de SB 225002.

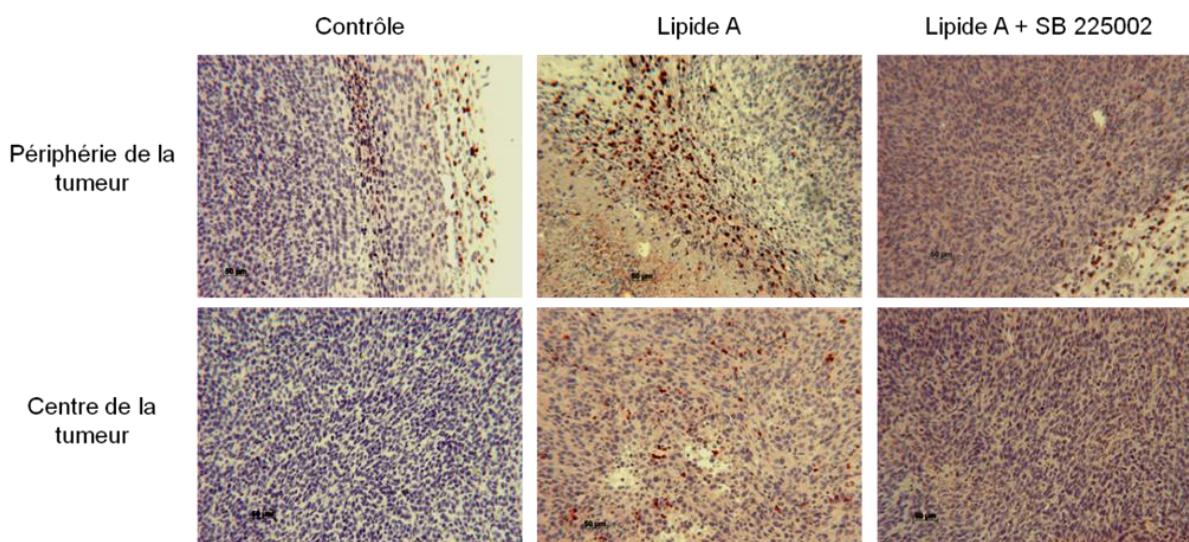


Figure 43 : marquage immunohistochimique des neutrophiles (brun / rouge) au sein de tumeurs de souris traitées ou non par le lipide A et le SB 225002. Les tumeurs ont été prélevées 24h après la cinquième injection de lipide A ou de sérum physiologique (J24), fixées et incluses en paraffine. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et un marquage immunohistochimique a mis en évidence les neutrophiles à l'aide d'un anticorps anti-Ly6G (brun / rouge).

Dans la figure 43, nous observons que chez les souris contrôles, quelques neutrophiles sont présents en périphérie des tumeurs mais quasiment aucun n'est détecté au centre des nodules. Lorsque l'on traite les animaux avec du lipide A, on observe une augmentation très importante de la quantité de neutrophiles tant en périphérie qu'au centre des tumeurs. Cependant, l'utilisation de l'antagoniste du récepteur CXCR2, SB 225002, bloque de manière efficace le recrutement des neutrophiles au sein des tumeurs des souris traitées par le lipide A.

Nous avons confirmé ces résultats par déplétion des cellules en utilisant un anticorps spécifique des neutrophiles, le Ly6G et un anticorps spécifique des granulocytes, le RB6-8C5. Nous avons injecté ces anticorps à des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées 24h avant l'injection de lipide A et le jour même puis nous avons mesuré le volume des tumeurs.

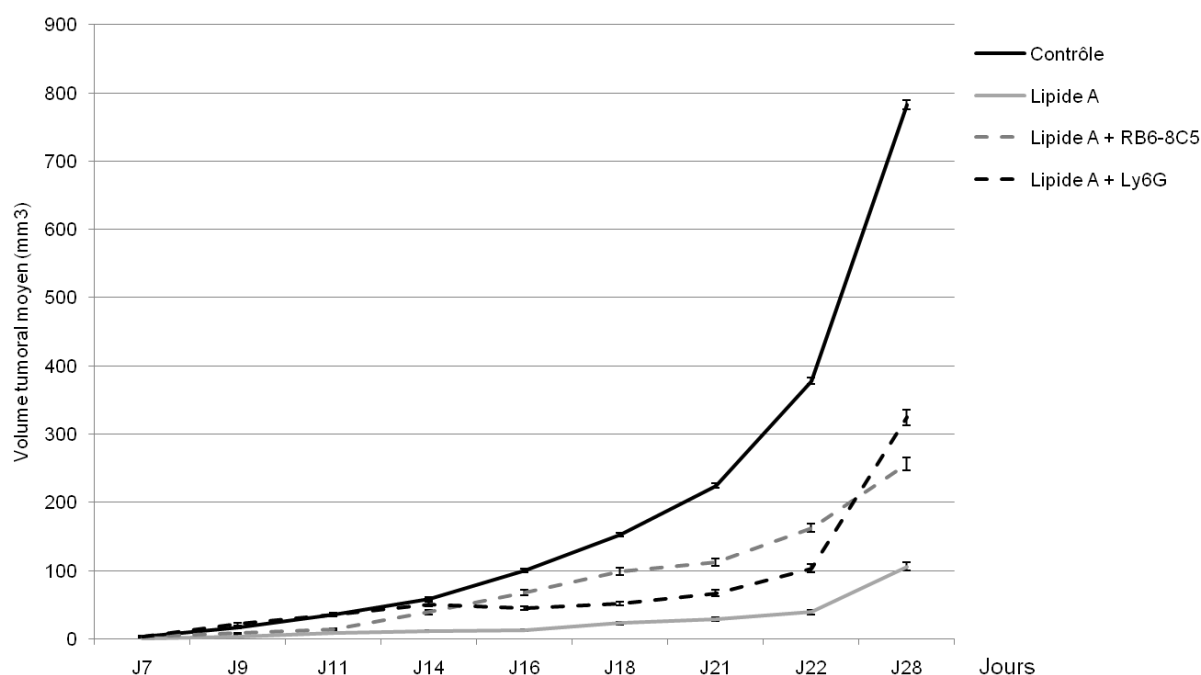


Figure 44 : courbes de croissance des tumeurs dans un modèle murin de tumeur sous-cutanée d'origine colique. Les souris Balb/C reçoivent $5 \cdot 10^5$ cellules CT26 par injection sous-cutanée à J0. Les souris sont traitées par 5 injections i.v. de lipide A (courbe grise) à 8 mg.kg^{-1} tous les 5 jours à partir de J3. Les anticorps déplétants des neutrophiles Ly6G (5 mg.kg^{-1} , courbe noire pointillée) et RB6-8C5 ($2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, courbe grise pointillée) sont injectés en i.p. 24h avant l'injection de lipide A et le jour même. Les souris contrôles (courbe noire) reçoivent du sérum physiologique.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 44, l'utilisation d'anticorps plus ou moins spécifiques des neutrophiles induit une diminution de l'effet antitumoral du lipide A sans toutefois l'inhiber totalement. Nous avons confirmé la déplétion des neutrophiles intratumoraux en réalisant des marquages immunohistochimiques.

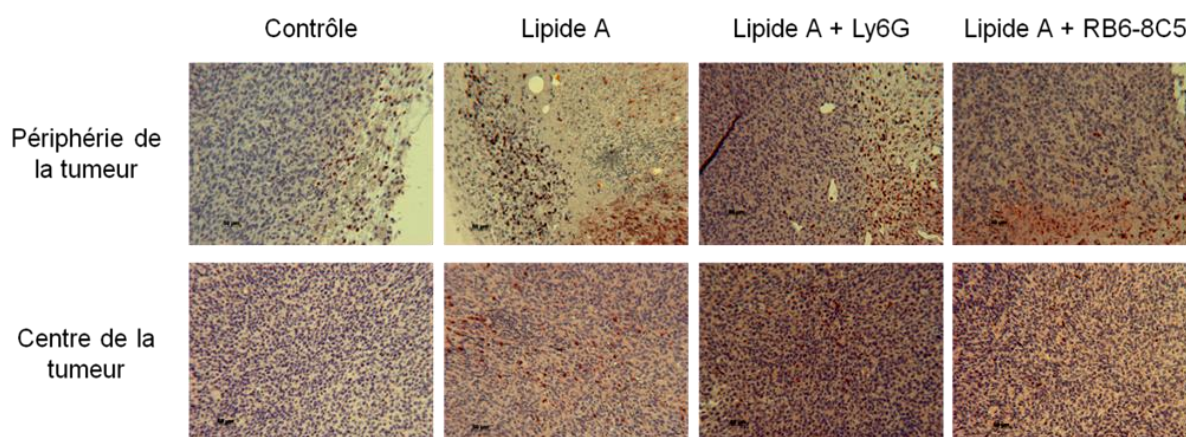


Figure 45 : Marquage immunohistochimique des neutrophiles (brun / rouge) au sein des tumeurs de souris traitées ou non par le lipide A et les anticorps Ly6G et RB6-8C5. Les tumeurs ont été prélevées 24h après la cinquième injection de lipide A (J24), fixées et incluses. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et un marquage immunohistochimique a mis en évidence les neutrophiles à l'aide d'un anticorps anti-Ly6G (brun / rouge).

L'utilisation d'anticorps déplétant les neutrophiles permet de diminuer de façon importante le nombre de neutrophiles recrutés en périphérie et au sein des tumeurs des souris traitées par le lipide A (figure 45).

Les résultats obtenus avec l'antagoniste de CXCR2 et les anticorps bloquants démontrent bien le rôle essentiel joué par les neutrophiles dans l'effet antitumoral du lipide A *in vivo*. Cependant, ils n'apportent aucune information quand à la façon dont les neutrophiles contribuent à l'efficacité antitumorale du lipide A.

IV. Rôle et origine du granzyme B dans l'efficacité antitumorale du lipide A

1. Le granzyme B est-il responsable de la mort par apoptose des cellules tumorales ?

Comme nous venons de le voir, les cellules tumorales meurent par apoptose dans les tumeurs des rats traités par le lipide A. Les cellules immunitaires peuvent induire la mort des cellules tumorales en agissant soit sur la voie extrinsèque de l'apoptose, via la fixation de ligands sur les récepteurs de mort FAS et TRAIL exprimés par les cellules tumorales, soit sur la voie intrinsèque, via la production et la sécrétion de molécules toxiques telles que le granzyme B.

Dans un premier temps nous avons recherché la présence de granzyme B dans les tumeurs et les cellules tumorales.

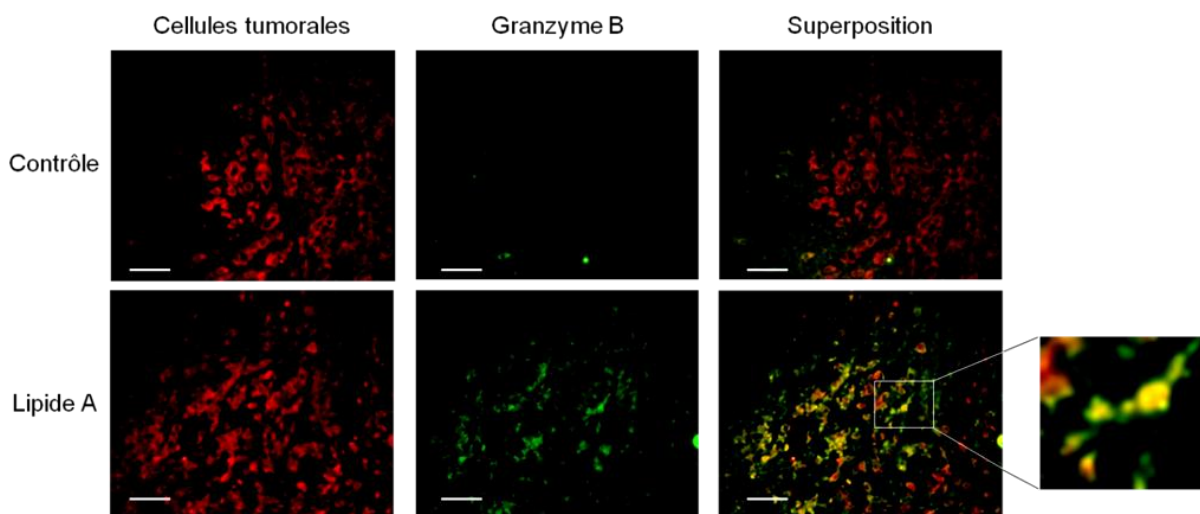


Figure 46 : marquage des cellules tumorales et du granzyme B dans les tumeurs de rats traités ou non par le lipide A. Les tumeurs ont été prélevées 24h après la deuxième injection de lipide A ou de sérum physiologique (J17), fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et des doubles marquages immunohistofluorescents ont permis de mettre en évidence les cellules tumorales à l'aide d'un anticorps anti-cytokératines (rouge) et d'un anticorps anti-granzyme B (vert). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Très peu de granzyme B est mis en évidence dans les tumeurs des rats contrôles (figure 46). A l'inverse, lorsque les rats sont traités par le lipide A nous observons un marquage prononcé de granzyme B. De plus, il y a colocalisation entre certaines cellules tumorales et le granzyme B, ce qui semble suggérer que ce dernier peut pénétrer dans les cellules tumorales.

Nous nous sommes alors demandé si la présence de granzyme B dans les cellules tumorales pouvait induire leur mort par apoptose. Pour répondre à cette question nous avons réalisé un double marquage immunohistofluorescent des cellules tumorales apoptotiques et du granzyme B.

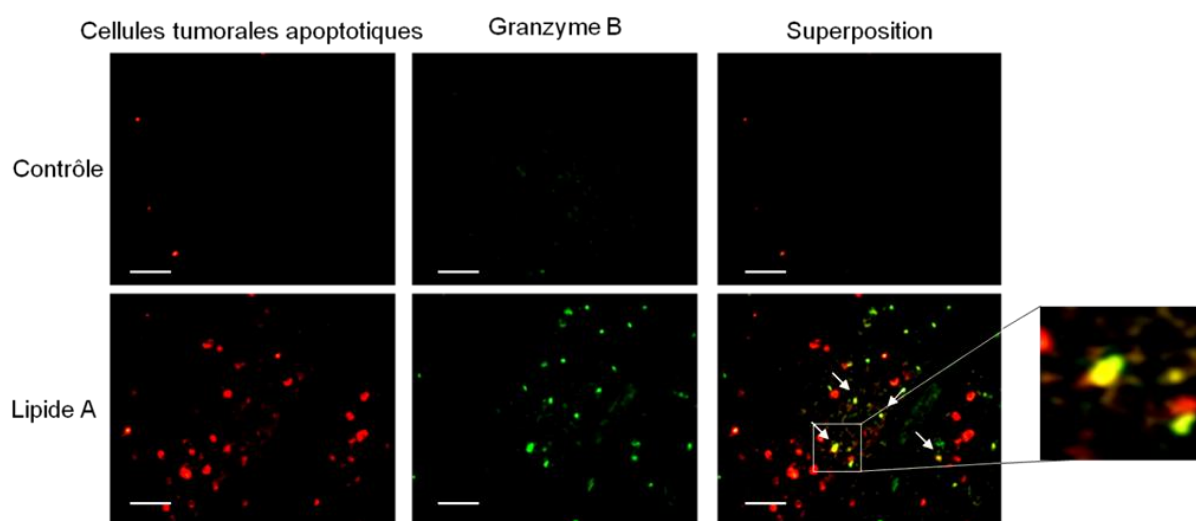


Figure 47 : marquage des cellules tumorales apoptotiques et du granzyme B dans les tumeurs de rats traités ou non par le lipide A. Les tumeurs ont été prélevées 24h après la deuxième injection de lipide A ou de sérum physiologique (J17), fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et des doubles marquages immunohistofluorescents ont permis de mettre en évidence les cellules tumorales apoptotiques à l'aide d'un anticorps anti-M30 (rouge) et d'un anticorps anti-granzyme B (vert). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Nous confirmons l'absence de granzyme B et de cellules tumorales apoptotiques dans les tumeurs des rats contrôles (figure 47). En revanche, nous observons une nette colocalisation entre certaines cellules tumorales apoptotiques et le granzyme B, confirmant notre hypothèse de l'implication du granzyme B dans l'effet antitumoral du lipide A.

2. Quelles sont les cellules productrices de granzyme B dans les tumeurs des rats traités par le lipide A ?

Il est classiquement admis que 1) les cellules productrices de granzyme B sont les cellules Natural Killer (NK) et les lymphocytes T cytotoxiques (lymphocytes T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$) et 2) que la mort est induite par le transfert du granzyme B dans les cellules cibles à la suite de la formation de synapses immunologiques impliquant un contact entre les cellules immunitaires et les cellules cibles. Nous avons donc recherché par marquages immunohistofluorescents la présence de ces populations de cellules immunitaires au sein des tumeurs.

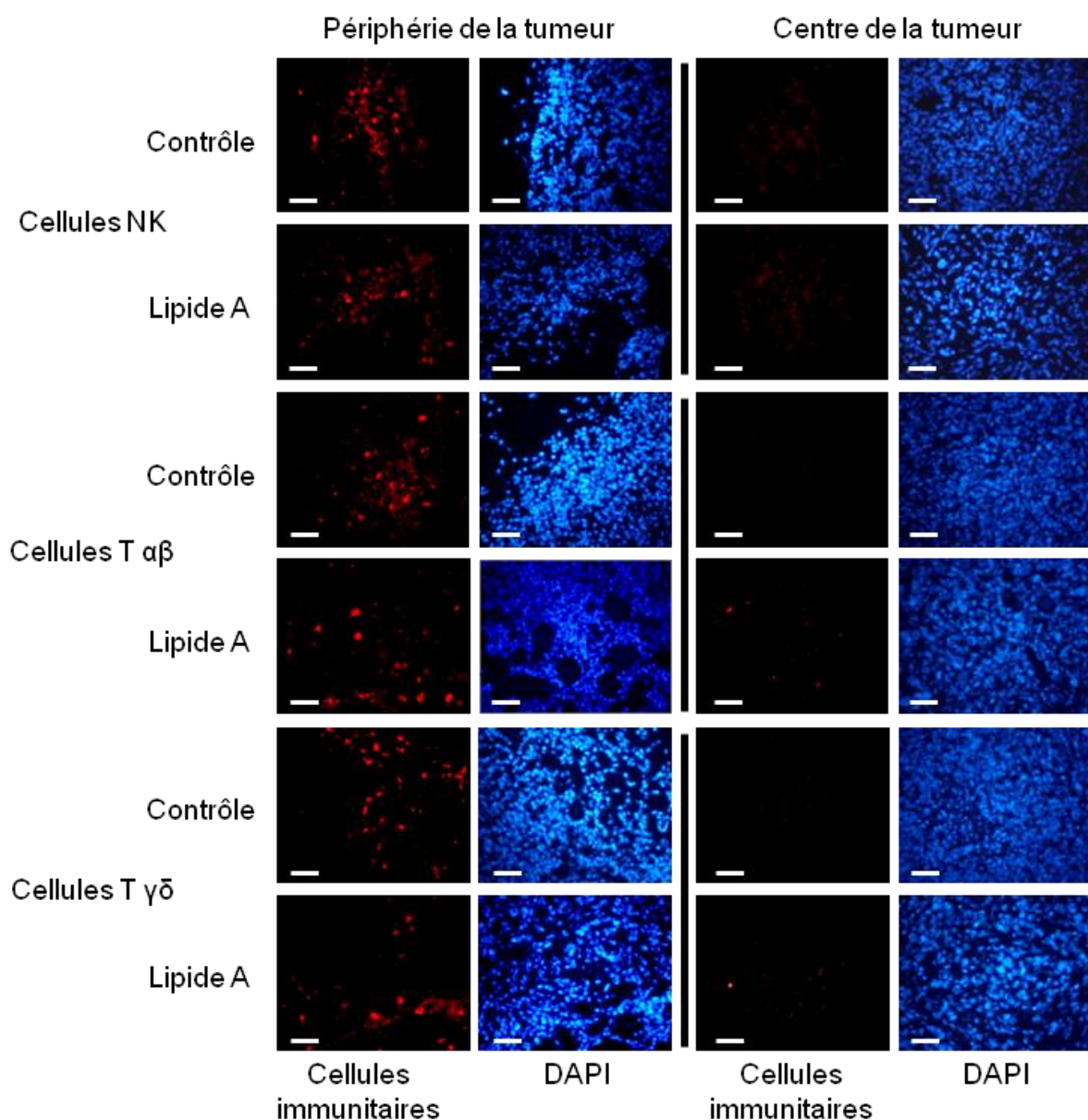


Figure 48 : marquage immunohistofluorescent des cellules NK, LT $\alpha\beta$ et LT $\gamma\delta$ dans les tumeurs de rats traités ou non par le lipide A. Les tumeurs ont été prélevées 24h après la deuxième injection de lipide A ou de sérum physiologique (J17), fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et les cellules immunitaires ont été mises en évidence par un marquage immunohistofluorescent à l'aide d'un anticorps anti-Nkp46 (rouge) pour les cellules NK, d'un anticorps anti-TCR $\alpha\beta$ pour les LT $\alpha\beta$ et d'un anticorps anti-TCR $\gamma\delta$ pour les LT $\gamma\delta$, les noyaux sont visibles grâce à un agent intercalant, le DAPI (bleu). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Quelque soit le traitement reçu par les rats, nous avons mis en évidence la présence en périphérie des tumeurs de nombreuses cellules NK ainsi que de lymphocytes T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ (figure 48). Cependant, très peu de ces cellules ont été observées au centre des tumeurs. Ces résultats nous permettent de conclure que le granzyme B présent dans les cellules tumorales apoptotiques ne peut provenir ni des cellules NK, ni des lymphocytes T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$.

Aucune des cellules immunitaires classiquement décrites comme productrices de granzyme B ne peuvent être impliquée dans la mort par apoptose des cellules tumorales, nous avons donc recherché si le granzyme B pouvait être produit par les neutrophiles. En effet, nous avons montré que les neutrophiles sont au contact des cellules tumorales apoptotiques au centre des tumeurs et que l'inhibition de leur recrutement induit une diminution de l'efficacité du traitement par le lipide A. De plus, une controverse existe concernant la possibilité pour les neutrophiles de synthétiser cette protéase. Nous avons donc réalisé un double marquage immunohistofluorescent des neutrophiles et du granzyme B.

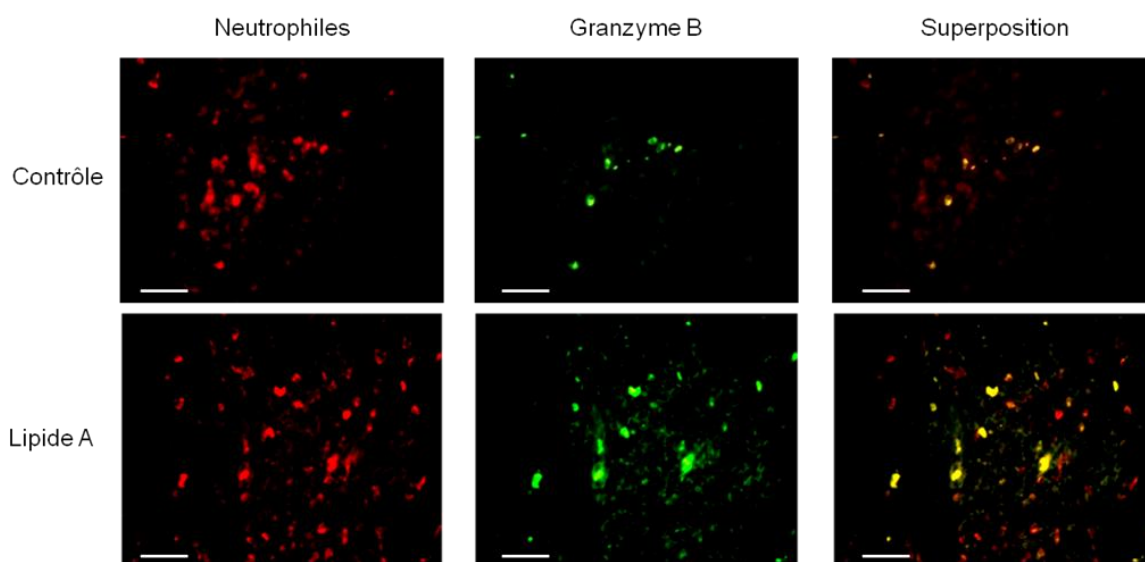


Figure 49 : marquage des neutrophiles et du granzyme B dans les tumeurs de rats traités ou non par le lipide A. Les tumeurs ont été prélevées 24h après la deuxième injection de lipide A ou de sérum physiologique (J17), fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et des doubles marquages immunohistofluorescents ont été réalisés à l'aide d'un anticorps anti-HIS48 (rouge) et d'un anticorps anti-granzyme B (vert). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Etonnamment nous avons observé que les neutrophiles intratumoraux pouvaient synthétiser du granzyme B et cela que les rats soient traités par le lipide A ou non (figure 49). Le granzyme B observé dans les cellules tumorales en apoptose semble donc être produit et sécrété par les neutrophiles intratumoraux.

V. La production et l'activité cytotoxique du granzyme B est-elle modulée par le lipide A ?

1. Le lipide A peut-il moduler la production de granzyme B par les neutrophiles ?

Nous venons de montrer que les neutrophiles intratumoraux sont les cellules productrices de granzyme B au centre des tumeurs et que le granzyme B pourrait être responsable, au moins partiellement, de la mort par apoptose de cellules tumorales.

De plus nous avons remarqué dans la figure 49 que lorsque les rats sont traités par le lipide A, le nombre de neutrophiles exprimant le granzyme B est nettement augmenté ainsi que l'intensité du marquage de la protéase, suggérant que le lipide A pourrait induire une augmentation de la production du granzyme B par les neutrophiles.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons isolé des neutrophiles spléniques de rats porteurs de tumeurs, traités ou non par le lipide A. Nous avons constaté que les rats traités par le lipide A présentent une splénomégalie importante. Après isolement, nous avons obtenu une suspension de neutrophiles d'une pureté supérieure à 95%.

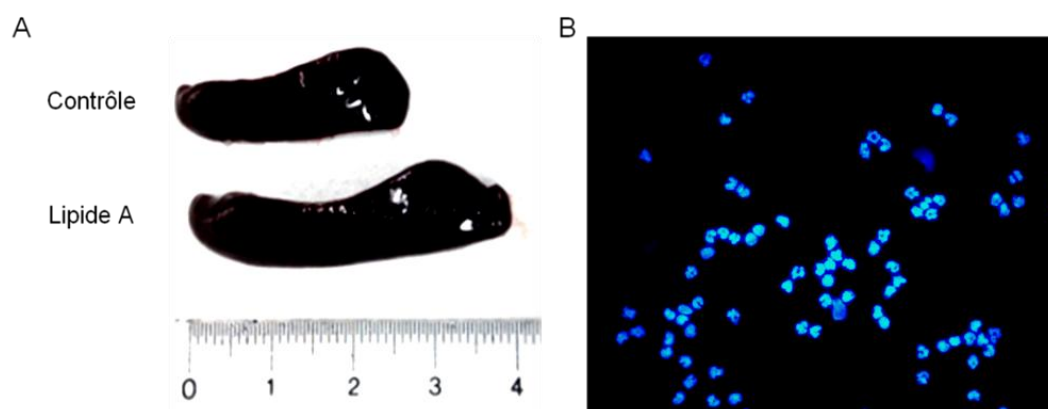


Figure 50 : Neutrophiles spléniques isolés à partir de rats porteurs de tumeurs traités ou non par le lipide A. (A) Les animaux ont été sacrifiés puis leur rate a été prélevée et mesurée. Les rates ont ensuite été dissociées et les neutrophiles ont été triés par Automacs, la pureté des neutrophiles a été évaluée par comptage. (B) Neutrophiles dont le noyau polylobé est mis en évidence par l'agent intercalant DAPI.

Une fois les neutrophiles isolés nous avons recherché la production et la sécrétion de granzyme B par ces cellules traitées ou non *in vitro* par le lipide A.

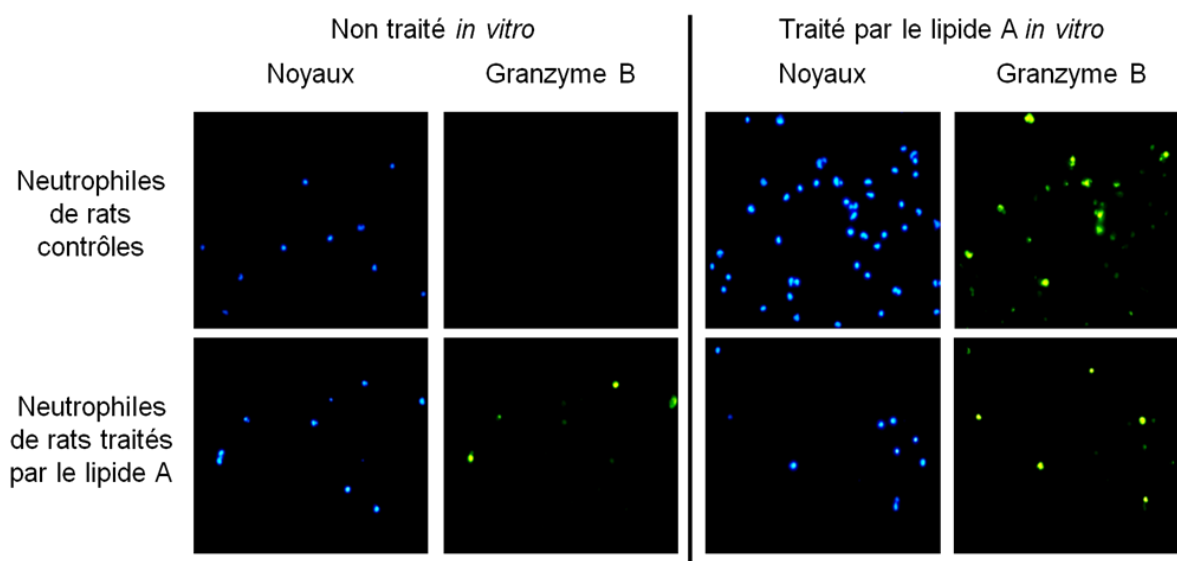


Figure 51 : marquage immunofluorescent du granzyme B synthétisé par des neutrophiles spléniques isolés de rats traités ou non par le lipide A et traités ou non *in vitro* par le lipide A. Les neutrophiles provenant de rats contrôles ou traités par le lipide A ont été isolés, traités ou non par le lipide A à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, incubés *in vitro* pendant 24h puis un marquage immunofluorescent du granzyme B a été réalisé (vert). Les noyaux des neutrophiles ont été mis en évidence avec du DAPI (bleu). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

A la différence des neutrophiles spléniques provenant de rats traités par le lipide A qui expriment du granzyme B qu'ils soient retraits ou non *in vitro*, les neutrophiles isolés des rats contrôles n'expriment pas de granzyme B (figure 51). Cependant, lorsque ces cellules sont traitées *in vitro* avec du lipide A, nous pouvons observer la production de granzyme B par ces neutrophiles.

Ces résultats démontrent que le lipide A induit la synthèse de granzyme B par les neutrophiles de rats.

2. Le lipide A induit-il la libération de granzyme B par les neutrophiles ?

Nous avons ensuite recherché si le lipide A était également responsable de la libération du granzyme B par les neutrophiles. Pour cela nous avons dosé par E.L.I.S.A. la quantité de granzyme B présent dans le surnageant de culture de neutrophiles spléniques isolés de rats traités ou non par le lipide A et traités ou non par le lipide A *in vitro*.

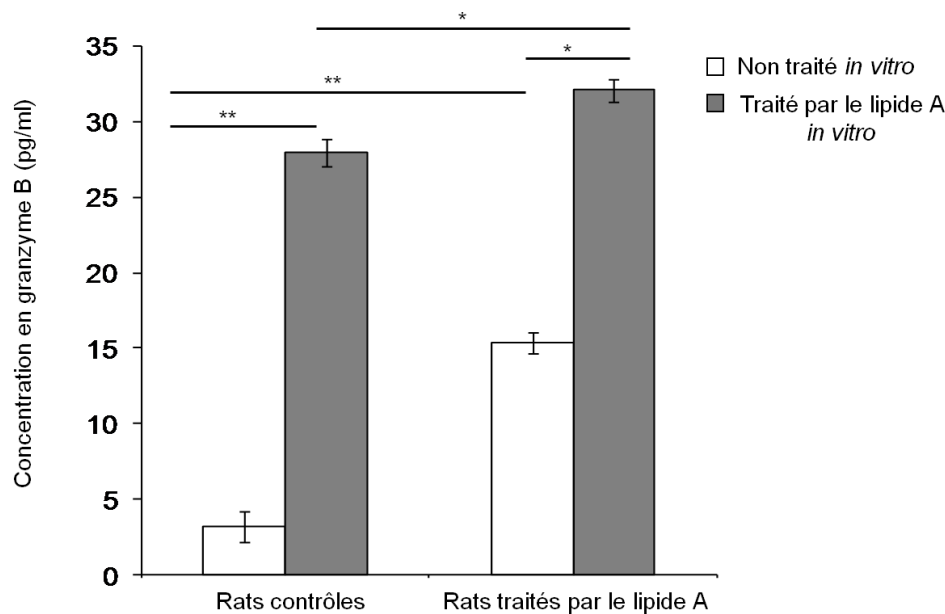


Figure 52 : dosage par E.L.I.S.A. du granzyme B libéré par les neutrophiles. Les neutrophiles provenant de rats de rats contrôles ou traités par le lipide A ont été isolés, traités ou non par le lipide A à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, incubés *in vitro* pendant 24h puis la concentration en granzyme B des surnageants de culture a été dosée par E.L.I.S.A. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, test statistique de Mann Whitney.

En accord avec les marquages immunofluorescents de la figure 50, les neutrophiles spléniques isolés de rats contrôles et non traités *in vitro* ne libèrent pas de granzyme B (figure 52). Cependant un traitement *in vitro* par le lipide A induit la libération d'environ 30 pg.mL^{-1} de protéase dans le milieu de culture des neutrophiles. Lorsque les neutrophiles sont isolés de rats traités par le lipide A, ils libèrent spontanément du granzyme B (environ 15 pg.mL^{-1}) et cette quantité augmente jusqu'à environ 35 pg.mL^{-1} lorsqu'ils sont traités *in vitro* par le lipide A.

Ces résultats démontrent que le lipide A induit la libération de granzyme B par les neutrophiles de rats.

3. Le granzyme B produit par les neutrophiles est-il cytotoxique pour les cellules tumorales *in vitro* ?

Les données issues des marquages immunohistofluorescents de la figure 46 semblent indiquer que le granzyme B libéré dans les tumeurs pourrait être cytotoxique pour les cellules tumorales et induire leur mort par apoptose. Pour valider notre hypothèse, nous avons ajouté sur des cellules tumorales les surnageants de culture des neutrophiles isolés de rates de rats contrôles traités ou non *in vitro* par le lipide A et nous avons évalué le pourcentage de cellules adhérentes après 24h.

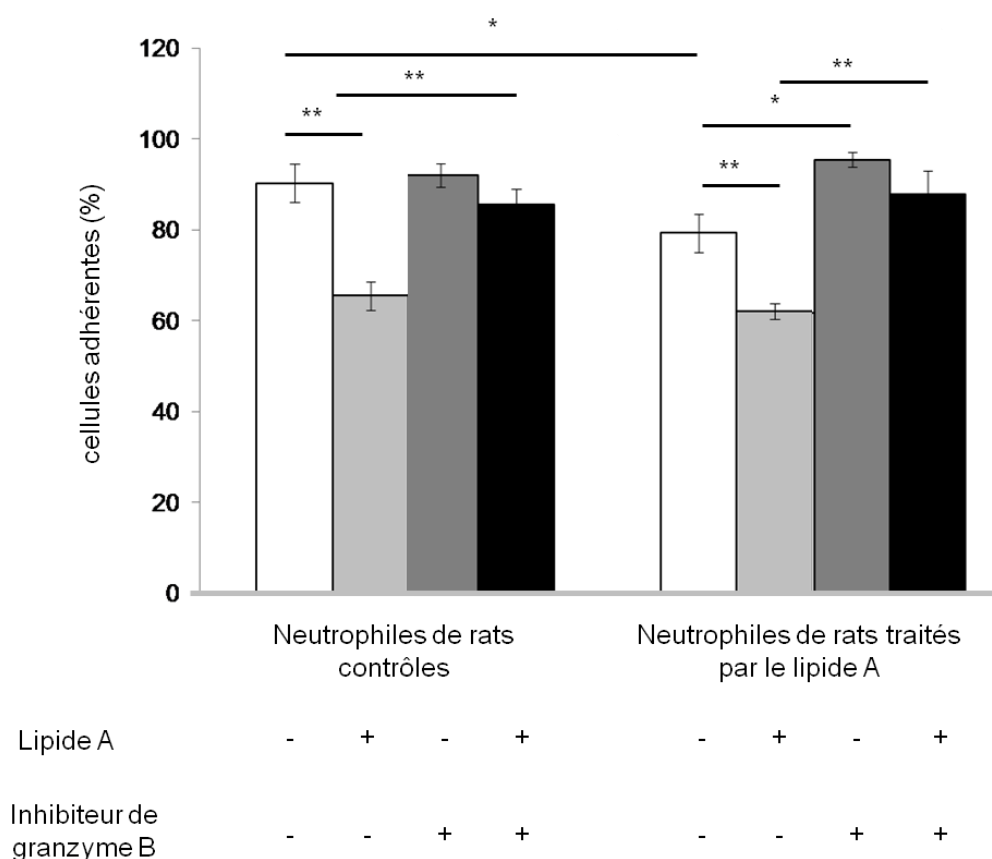


Figure 53 : évaluation de la cytotoxicité du granzyme B présent dans les surnageants de culture des neutrophiles. Les neutrophiles provenant de rate de rats contrôles ou traités par le lipide A ont été isolés, traités ou non par le lipide A à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, incubés *in vitro* pendant 24h. Les cellules tumorales PROb sont incubées en présence ou non d'un inhibiteur de granzyme B pendant 24h avec les surnageants de culture des neutrophiles dont l'effet toxique est évalué par un test au bleu de méthylène. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, test statistique de Mann Whitney.

Les surnageants de neutrophiles isolés de rats contrôles ne sont pas cytotoxiques pour les cellules tumorales, contrairement à ceux des neutrophiles isolés de rats traités par le lipide A qui induisent la mort d'environ 20% des cellules tumorales (figure 53). Le traitement *in vitro* par le lipide A des neutrophiles augmente la cytotoxicité des surnageants (environ 35% de mort des cellules tumorales) et cela que les neutrophiles soient isolés de rats traités par le lipide A ou non.

L'ajout d'un inhibiteur spécifique de granzyme B abolit presque totalement la cytotoxicité des surnageants de culture des neutrophiles, confirmant le rôle majeur du granzyme B dans la mort des cellules tumorales *in vitro*.

4. Le granzyme B est-il impliqué dans l'effet antitumoral du lipide A *in vivo* ?

Nous avons montré dans la figure 53 que le granzyme B libéré par les neutrophiles induisait la mort des cellules tumorales *in vitro*, nous avons alors souhaité savoir s'il était également impliqué dans l'effet antitumoral du lipide A. Pour répondre à cette question nous avons transformé des cellules de cancer colique murin CT26 afin qu'elles sur-expriment la serpène B9, une protéine inhibitrice du granzyme B.

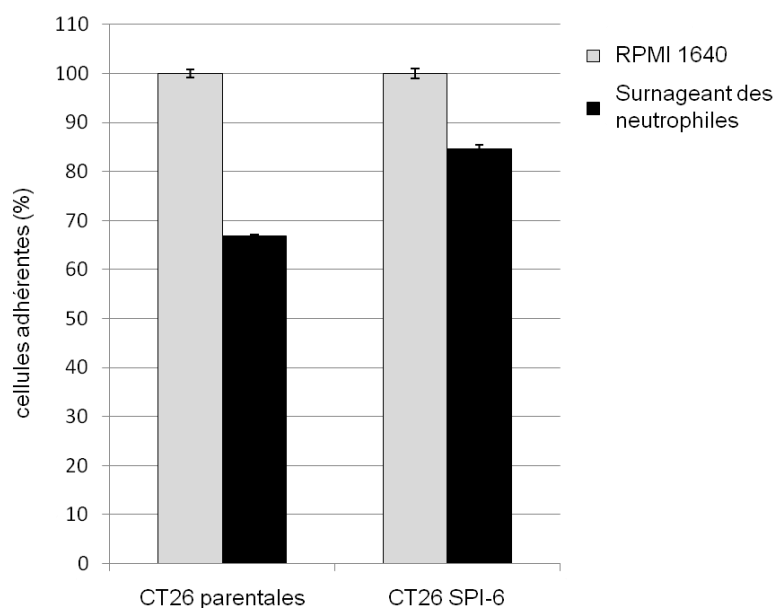


Figure 54 : évaluation de la cytotoxicité du granzyme B vis-à-vis de cellules CT26 surexprimant ou non la serpène B9. Des neutrophiles provenant de la moelle osseuse de souris Balb/C ont été isolés, traités *in vitro* pendant 24h par le lipide A à 500 ng.mL⁻¹. Les cellules tumorales CT26 parentales ou surexprimant la serpène B9 (CT26 SPI-6) sont ensuite incubées pendant 24h avec les surnageants de culture des neutrophiles dont l'effet toxique est évalué par un test au bleu de méthylène.

Les surnageants de culture de neutrophiles murins traités *in vitro* par le lipide A induisent la mort d'environ 35% des cellules CT26 parentales (figure 54). Cet effet cytotoxique est diminué lorsque les surnageants de culture de neutrophiles sont mis en présence de cellules CT26 SPI-6 surexprimant la serpène B9 (environ 15% de cytotoxicité).

Nous avons donc décidé d'utiliser ce clone de cellules CT26 surexprimant la serpène B9 pour tester *in vivo* le rôle du granzyme B dans l'efficacité antitumorale du lipide A dans un modèle de tumeurs sous-cutanées d'origine colique induite chez la souris Balb/C (voir figure 42).

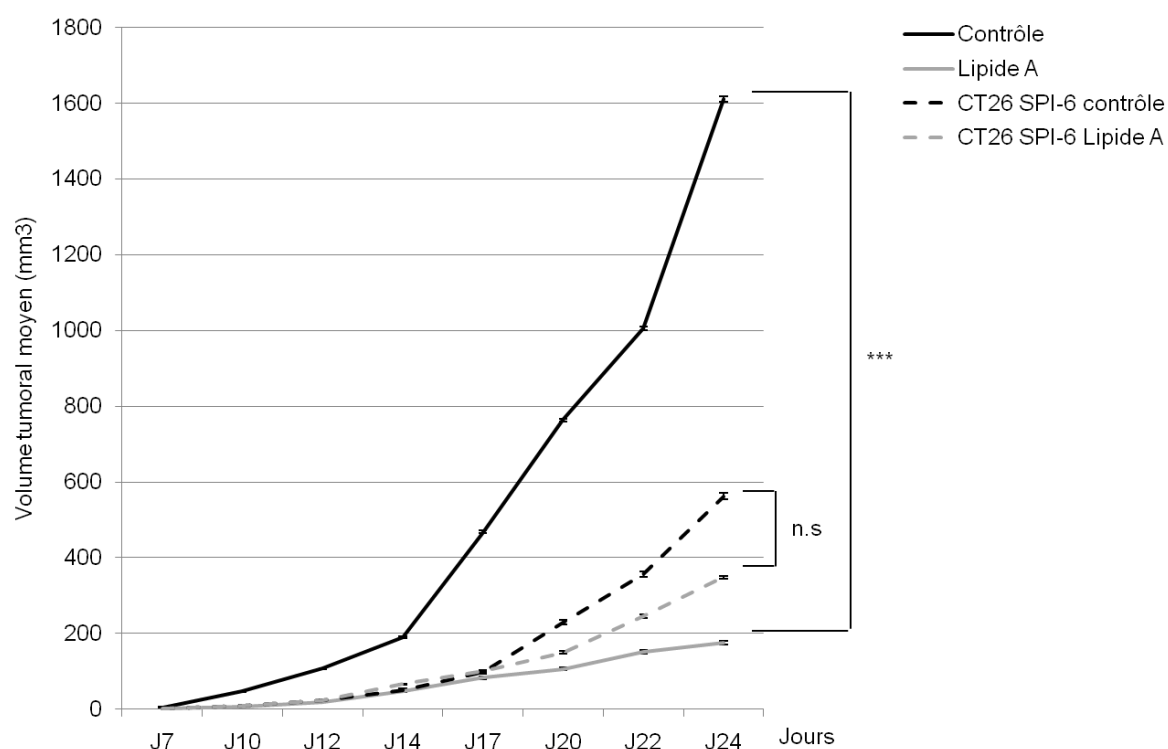


Figure 55 : courbes de croissance des tumeurs dans un modèle murin de tumeurs sous-cutanées d'origine colique. Les souris Balb/C reçoivent 5.10^5 cellules CT26 parentales ou surexprimant la serpine B9 par injection sous-cutanée à J0. Les souris sont traitées par 5 injections i.v. de lipide A (courbe grise) à 8 mg.kg^{-1} tous les 5 jours à partir de J3. Les souris contrôles (courbe noire) reçoivent du sérum physiologique. *** $<0,005$, n.s. non significatif, test statistique de Mann Whitney.

Le traitement par le lipide A ralenti de manière très importante la progression des tumeurs chez les souris ayant reçu des cellules CT26 parentales (figure 42 et 55). Lorsque les souris ont été injectées avec des cellules surexprimant la serpine B9, l'efficacité du lipide A est très fortement diminuée, confirmant le rôle essentiel du granzyme B dans l'effet antitumoral du lipide A *in vivo*.

VI. L'interaction du lipide A avec le microenvironnement module la production de granzyme B par les neutrophiles

1. Modulation du microenvironnement par le lipide A

De manière assez surprenante, nous avons montré que les neutrophiles intratumoraux produisent du granzyme B que les rats soient traités ou non par le lipide A (figure 49). Cependant, les neutrophiles spléniques isolés de rats contrôles ne semble pas synthétiser de granzyme B (figure 51, 52 et 56).

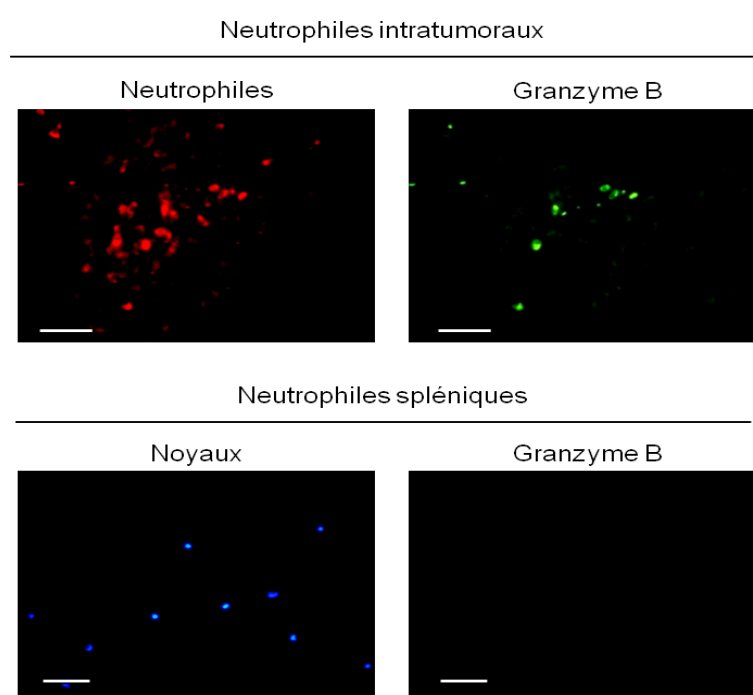


Figure 56 : détection par immunofluorescence de granzyme B dans les neutrophiles de rats contrôles.

Nous avons émis l'hypothèse que certaines cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral pourraient induire la production de granzyme B par les neutrophiles intratumoraux. Dans la littérature quatre cytokines sont décrites comme régulant de manière positive la synthèse de granzyme B par les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques, il s'agit des interleukines 2 (IL-2), 12 (IL-12) et 21 (IL-21) et de l'interféron gamma (IFN γ). Nous avons donc décidé de comparer par RT-PCR les niveaux d'expression des gènes de ces cytokines dans les tumeurs et dans les rates de rats contrôles et traités par le lipide A.

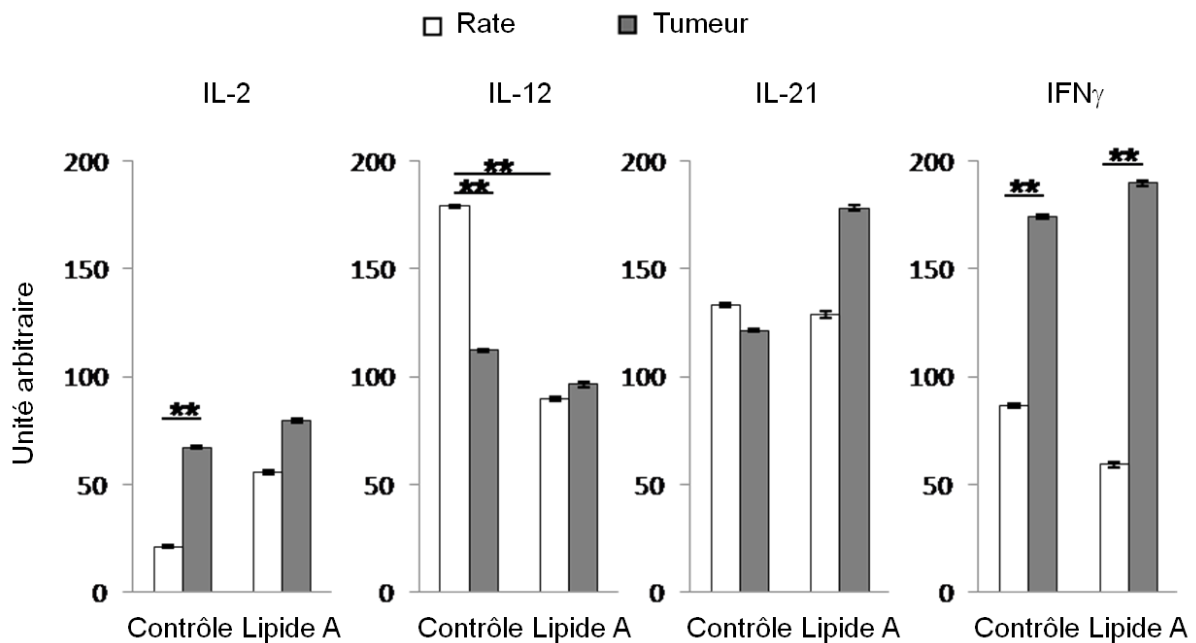


Figure 57 : variation de l'expression des gènes de l'*IL-2*, *-12*, *-21* et de l'*IFN γ* . Les tumeurs et les rates ont été prélevées 6h après la deuxième injection de lipide A ou de sérum physiologique (J17) et les ARN totaux ont été extraits. Analyse par densitométrie des différences d'expression des gènes *il-2*, *-12*, *-21* et *ifn γ* par rapport à l'expression du gène de la *gapdh* (ImageJ). ** $p < 0,01$, test statistique de Mann Whitney.

Chez les rats contrôles nous avons mis en évidence une expression plus importante des gènes de l'*il-2* et de l'*ifn γ* dans les tumeurs par rapport à celle trouvée dans les rates (figure 57). Inversement, l'expression du gène de l'*il-12* est plus importante dans les rates. Aucune variation significative de l'expression du gène de l'*il-21* n'a été mise en évidence entre les deux tissus.

Lorsque les rats sont traités par le lipide A, nous n'observons plus de différences significatives des niveaux d'expression des gènes de l'*il-2* et de l'*il-12* entre les tumeurs et les rates. Le traitement par le lipide A semble augmenter l'expression de l'*il-2* dans la rate et diminuer celle de l'*il-12* dans les tumeurs. En revanche, l'expression du gène de l'*ifn γ* est toujours significativement plus importante dans les tumeurs que dans les rates et le niveau d'expression du gène de l'*il-21* ne varie toujours pas de manière significative.

2. Rôle du microenvironnement dans la libération de granzyme B par les neutrophiles :

Les résultats de la figure 57 démontrent que le traitement par le lipide A modifie les microenvironnements tumoraux et spléniques en modulant les niveaux d'expression des cytokines *il-2*, *il-12* et *ifn*γ.

Puisque ces cytokines sont décrites comme pouvant moduler la production de granzyme B par les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques, nous avons étudié leur implication dans la libération de granzyme B par les neutrophiles. Pour cela nous avons traité pendant 24h des neutrophiles spléniques isolés de rats contrôles avec le mélange des trois interleukines (ILs : IL-2, -12 et -21) et / ou l'interféron gamma. De plus nous avons également ajouté du lipide A afin de déterminer si la quantité de granzyme B produite par les neutrophiles est augmentée lorsqu'ils sont traités par le lipide A et par les cytokines.

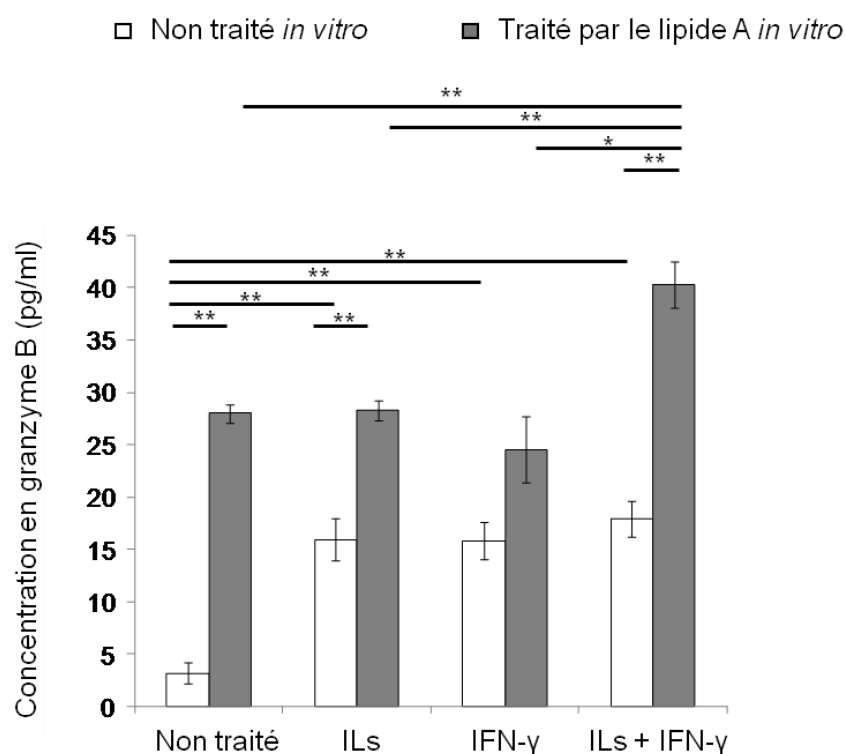


Figure 58 : dosage par E.L.I.S.A. du granzyme B libéré par les neutrophiles. Les neutrophiles provenant de rate de rats contrôles ont été isolés, traités ou non par le mélange d'interleukines (ILs), par l'IFNγ et par le lipide A à 10 µg.mL⁻¹, incubés *in vitro* pendant 24h puis la concentration en granzyme B des surnageants de culture a été dosée par E.L.I.S.A. *p<0,05, **<0,01, test statistique de Mann Whitney.

Lorsque les neutrophiles sont traités par les interleukines, l'interféron gamma ou par les quatre cytokines nous avons mesuré la libération dans les surnageants de culture d'environ 15 pg.mL⁻¹ de granzyme B alors que les neutrophiles non traités n'en libèrent pas (figure 58). Le traitement par le lipide A induit la libération d'environ 25 pg.mL⁻¹ de granzyme B, que les neutrophiles soient traités par le lipide A seul ou associé aux interleukines ou à l'interféron gamma. Seule la combinaison des quatre cytokines augmente significativement la libération par les neutrophiles de granzyme B induite par le lipide A (environ 40 pg.mL⁻¹).

Les résultats présentés démontrent que l'efficacité antitumorale de l'immunothérapie par un lipide A est dépendante d'une part du recrutement des neutrophiles de type N1 au sein des tumeurs et d'autre part de la modification du microenvironnement tumoral qui va favoriser la synthèse et la libération par les neutrophiles de granzyme B, induisant la mort par apoptose des cellules tumorales.

Lorsque les rats sont porteurs de carcinomatoses plus avancées, l'efficacité antitumorale de l'immunothérapie par le lipide A est fortement diminuée. Cependant, des travaux précédents ont montré que la combinaison d'un traitement par chimiothérapie avec le lipide A restaure l'efficacité de ce dernier et guérit les animaux. Les données issues de l'étude des mécanismes d'action de cette association sont présentées dans la prochaine partie des résultats.

2^{ème} Partie

Rôle de la sénescence dans l'efficacité antitumorale de la combinaison oxaliplatine / lipide A

I. L'association Oxaliplatine / lipide A guérit les rats porteurs de carcinomatoses péritonéales d'origine colique avancées

1. Survie des rats BD IX porteurs de carcinomatoses avancées

Les rats BD IX reçoivent par injection i.p. 10^6 cellules cancéreuses coliques syngéniques PROb en phase exponentielle de croissance. Les animaux vont développer des carcinomatoses péritonéales qui vont envahir progressivement toute la cavité péritonéale et induire la production d'ascite hémorragique. Le traitement commence 21 jours (J21) après l'injection des cellules tumorales par une injection i.p. d'oxaliplatine à 3 mg.kg^{-1} et puis une semaine plus tard 15 injections i.v. de lipide A à 1 mg.kg^{-1} , au rythme de trois injections par semaine durant 5 semaines consécutives. Les animaux contrôles reçoivent des injections i.v. de sérum physiologique.

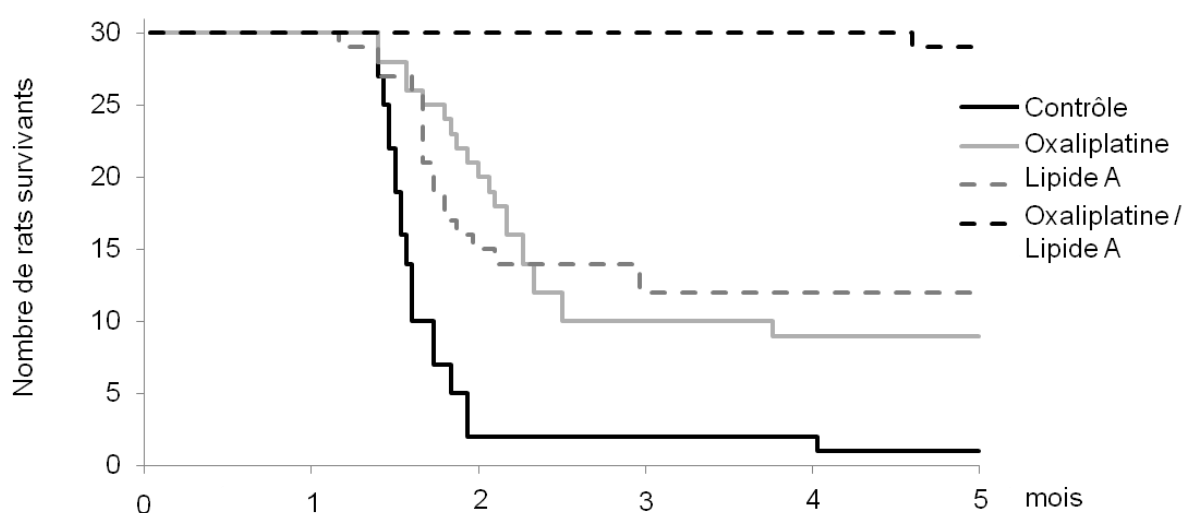


Figure 59 : courbes de survie de rats porteurs de tumeurs coliques traités ou non par l'association oxaliplatine / lipide A. Les rats BD IX reçoivent 10^6 cellules PROb par injection i.p. à J0. Ils sont traités par une injection i.p. d'oxaliplatine (courbe grise) à 3 mg.kg^{-1} à J21 ou par 15 injections i.v. de lipide A (courbe grise pointillée) à 1 mg.kg^{-1} à partir de J28 et 3 fois par semaine, ou par la combinaison oxaliplatine / lipide A (courbe noire pointillée). Les rats contrôles (courbe noire) reçoivent du sérum physiologique.

La plupart des rats du groupe contrôle meurent dans les deux mois après le début de l'expérience (figure 59). Concernant les groupes recevant une monothérapie, environ 30% des animaux sont guéris par l'oxaliplatine et 40% le sont par le lipide A. Cependant la

combinaison oxaliplatine / lipide A guérit 95% des rats porteurs de tumeurs. L'autopsie des animaux lors de leur mort atteste de l'absence de nodules tumoraux et d'ascite hémorragique dans la cavité péritonéale.

2. Le traitement par la combinaison oxaliplatine / lipide A induit la diminution de la quantité de cellules tumorales

Afin de confirmer l'effet antitumoral de la combinaison oxaliplatine / lipide A, nous avons réalisé des marquages immunohistochimiques des cellules tumorales en utilisant un anticorps dirigé contre les cytokératines, filaments intermédiaires spécifiquement exprimés dans les tissus épithéliaux.

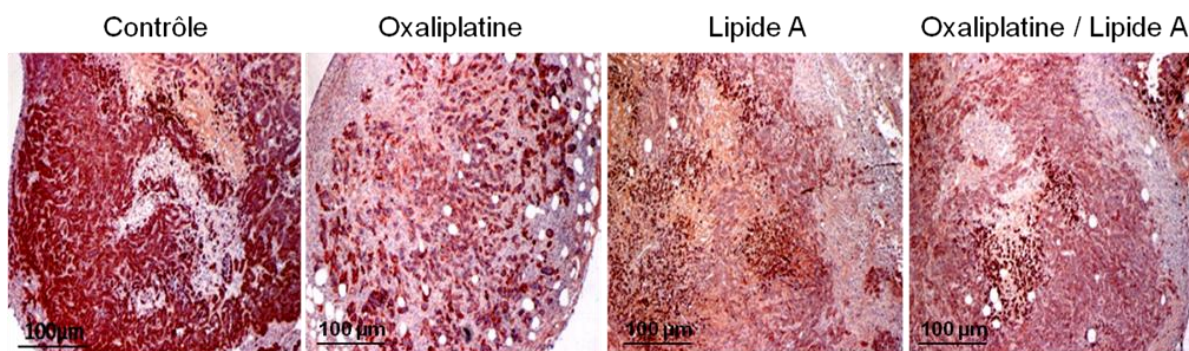


Figure 60 : marquage immunohistochimique des cellules tumorales au sein des nodules de rats. Les nodules sont prélevés 24h après la quatrième injection de lipide A ou de sérum physiologique (J36), fixés et inclus en paraffine. Des coupes de 5 µm ont été préparées et un marquage avec un anticorps anti-cytokératines (brun / rouge) a été réalisé. Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

Ces marquages nous ont permis de mettre en évidence une diminution très nette du nombre de cellules tumorales dans les nodules prélevés chez les rats traités par la combinaison oxaliplatine / lipide A par rapport à ceux prélevés chez les rats contrôles (figure 60). Lorsque les animaux reçoivent une monothérapie, quelle qu'elle soit, la diminution du nombre de cellules tumorales est plus faible.

Nous avons également observé la présence d'une couronne de cellules à petit noyau en périphérie des nodules correspondant à un anneau de cellules immunitaires. Il semble que les traitements, monothérapies et combinaisons, induisent une augmentation de l'épaisseur de cet

anneau, probablement du fait d'un recrutement de cellules immunitaires en direction des tumeurs lorsque les animaux sont traités.

3. Mise en évidence de la mort par apoptose des cellules tumorales chez les rats traités

Nous avons montré que les traitements, monothérapies et combinaison, induisent une diminution du nombre de cellules tumorales dans les tumeurs (figure 60), nous avons donc cherché si cela était dû à la mort par apoptose des cellules tumorales. Pour cela, nous avons réalisé un marquage T.U.N.E.L. sur des coupes de tumeurs de rats traités ou non, prélevées à J29, soit 24h après la première injection de lipide A.

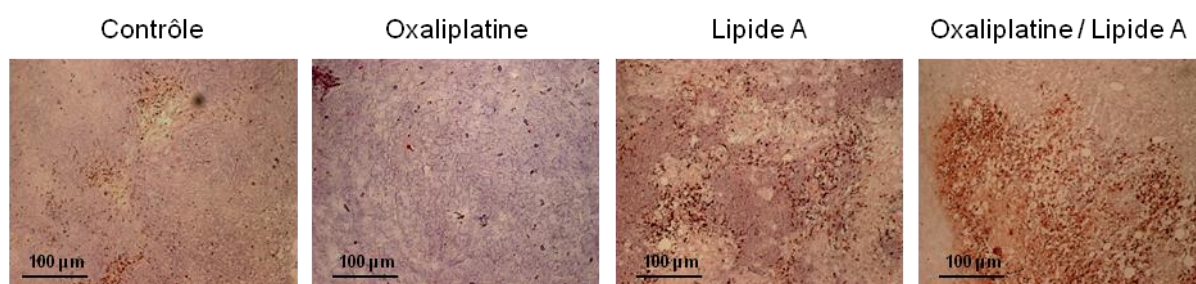


Figure 61 : marquage T.U.N.E.L. réalisé sur des coupes de tumeurs de rats traités ou non.

Les tumeurs ont été prélevées 24h après la première injection de lipide A ou de sérum physiologique (J29), fixées et incluses en paraffine. Des coupes de 5 µm ont été réalisées et les cellules apoptotiques (colorées en marron/rouge) ont été mises en évidence par la méthode T.U.N.E.L. Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Nous constatons que le traitement par le lipide A seul ou en association avec l'oxaliplatine induit l'entrée en apoptose des cellules au sein des tumeurs (figure 61). Cependant, l'induction de l'apoptose est bien plus importante lorsque les rats sont traités par la combinaison oxaliplatine / lipide A. On constate également que l'oxaliplatine seul n'induit par la mort par apoptose de cellules au sein des tumeurs.

Nous avons utilisé l'anticorps M30 afin de déterminer si les cellules apoptotiques mises en évidence sont des cellules tumorales.

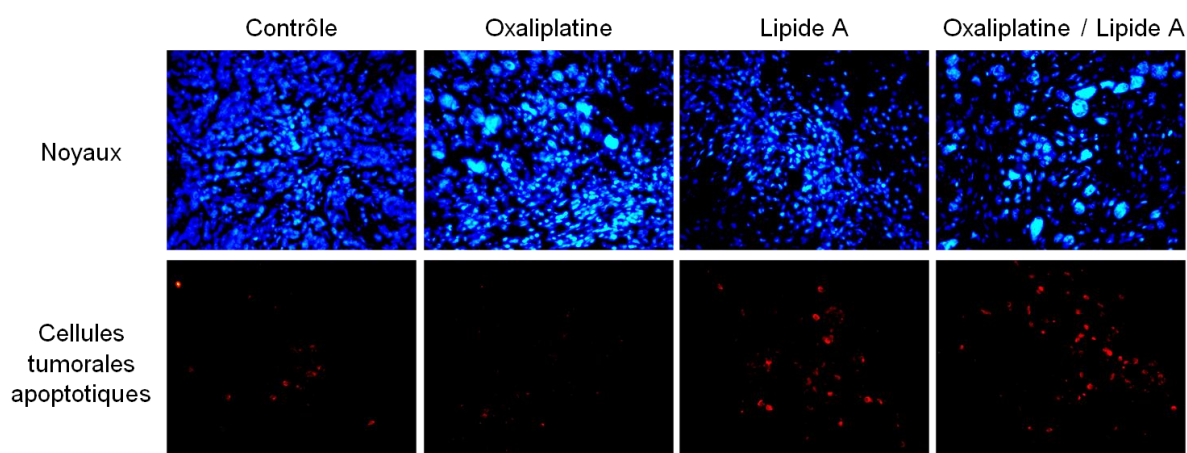


Figure 62 : marquage immunohistofluorescent des cellules tumorales apoptotiques dans les tumeurs de rats traités ou non. Les tumeurs ont été prélevées 24h après la première injection de lipide A ou de sérum physiologique (J29), fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et les cellules tumorales apoptotiques ont été mises en évidence par un marquage immunohistofluorescent à l'aide d'un anticorps anti-M30 (rouge), les noyaux sont visible grâce à un agent intercalant de l'ADN, le DAPI (bleu). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Le traitement par le lipide A, seul ou en combinaison avec l'oxaliplatine, induit l'apoptose de cellules tumorales contrairement à la monothérapie par l'oxaliplatine qui ne semble pas induire d'apoptose des cellules tumorales (figure 62). Cependant, le marquage est réalisé sur des tumeurs prélevées 8 jours après l'injection d'oxaliplatine. Afin de confirmer l'absence d'induction de l'apoptose des cellules tumorales par l'oxaliplatine nous avons réalisé un marquage immunohistochimique des cellules apoptotiques par la méthode T.U.N.E.L. 24h après l'injection d'oxaliplatine.

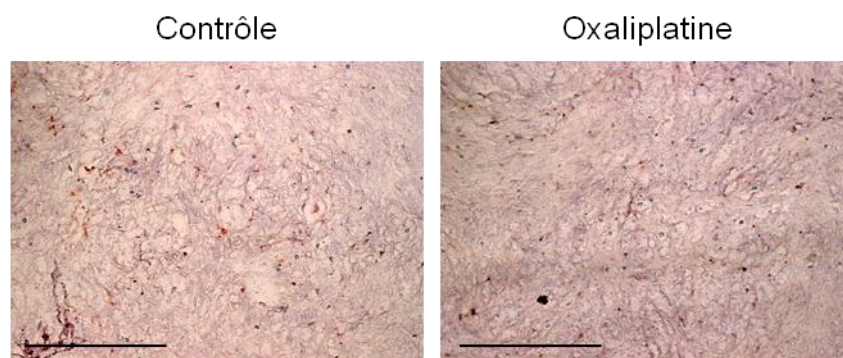


Figure 63 : marquage T.U.N.E.L. réalisé sur des coupes de tumeurs de rats traités ou non par l'oxaliplatine. Les tumeurs ont été prélevées 24h après l'injection d'oxaliplatine ou de sérum physiologique (J22), fixées et incluses en paraffine. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et les cellules apoptotiques (colorées en marron/rouge) ont été mises en évidence par la méthode T.U.N.E.L. Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Aucune différence n'est mise en évidence entre les tumeurs des rats du groupe contrôle et celle des rats traités par l'oxaliplatine (figure 63). Nous pouvons donc conclure que dans notre modèle l'oxaliplatine n'induit par la mort par apoptose des cellules tumorales.

Cependant, nous avons mis en évidence un plus grand nombre de cellules apoptotiques dans les tumeurs des rats traités par la combinaison oxaliplatine / lipide A par rapport aux rats traités par monothérapie (figure 61). L'oxaliplatine étant injecté aux rats une semaine avant le lipide A, l'augmentation de l'efficacité antitumorale de l'immunothérapie doit donc être une conséquence des effets de l'oxaliplatine. Nous avons donc recherché les effets de l'oxaliplatine sur les cellules tumorales afin d'expliquer l'effet synergique de la combinaison oxaliplatine / lipide A.

II. L'oxaliplatine et la sénescence

1. L'oxaliplatine induit la sénescence de cellules dans les tumeurs

Lors des observations réalisées sur les coupes des tumeurs de rats traités par l'oxaliplatine, nous avons remarqué la présence de cellules tumorales avec des noyaux très volumineux (figure 62). Cette caractéristique pourrait être le signe d'une entrée en sénescence de ces cellules.

a) Mise en évidence des cellules sénescents par coloration au X-Gal

Pour vérifier cette hypothèse nous avons réalisé une coloration par le X-gal de coupes de tumeurs de rats. Une enzyme lysosomale, la Senescent-Associated- β -Galactosidase (SA- β -Gal), fortement exprimée par les cellules sénescents catalyse un composé chromogène, le X-gal, dont le produit de dégradation bleu précipite dans la cellule, permettant de colorer en bleu les cellules sénescents.

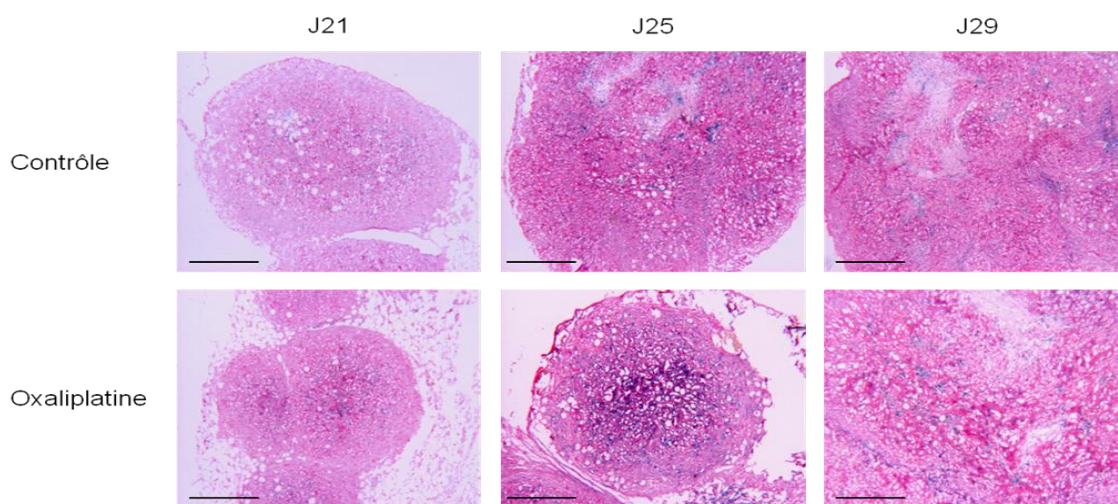


Figure 64 : coloration au X-gal des cellules sénescents dans les tumeurs de rats traités ou non par l'oxaliplatine. Les tumeurs ont été prélevées 6h (J21), 96h (J25) et 8 jours (J29) après l'injection d'oxaliplatine ou de sérum physiologique, fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et les cellules sénescents ont été mises en évidence par une coloration au X-Gal (bleu), les noyaux des cellules ont été colorés au nuclear fast red (rose). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

A J21, peu de cellules sénescents sont visibles dans les tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine et contrôles (figure 64). Cependant, nous avons en évidence une augmentation très importante de la quantité de cellules sénescents à partir de J25 dans les tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine. Ces résultats confortent notre hypothèse selon laquelle l'oxaliplatine pourrait induire la sénescence de cellules dans les tumeurs des animaux traités.

b) Mise en évidence des cellules tumorales sénescents par coloration au DDAO

Nous avons utilisé un substrat fluorescent de la SA- β -Gal, le DDAOG, qui est clivé en un composé fluorescent rouge, le DDAO, pour déterminer par un double marquage immunohistofluorescent si les cellules sénescents sont des cellules tumorales.

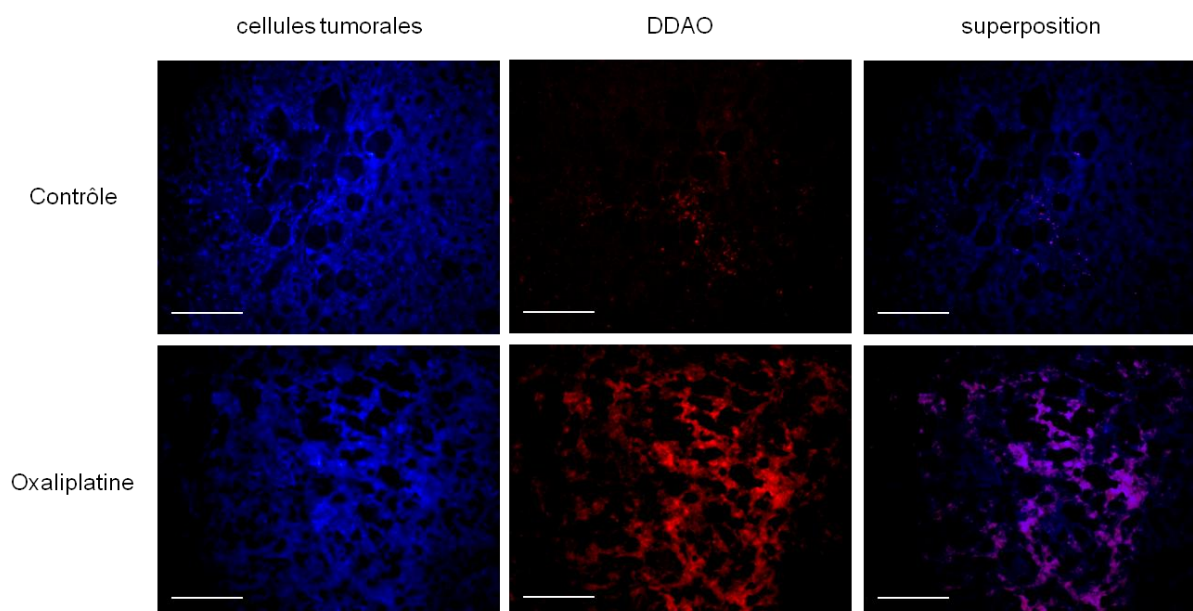


Figure 65 : coloration fluorescente des cellules tumorales sénescents dans les tumeurs de rats traités ou non par l'oxaliplatine. Les tumeurs ont été prélevées 8 jours après l'injection d'oxaliplatine ou de sérum physiologique (J29), fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et un double marquage immunohistofluorescent a permis de mettre en évidence les cellules tumorales à l'aide d'un anticorps anti-cytokératines (bleu) et les cellules sénescents par coloration par le DDAO (rouge). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Très peu de cellules tumorales sénescents ont été mises en évidence dans les tumeurs des rats contrôles (figure 65). A l'inverse, de très nombreuses cellules tumorales sénescents sont visibles lorsque les rats ont été traités par l'oxaliplatine.

c) Mise en évidence de la sénescence par analyse de l'expression de gènes marqueurs

L'entrée en sénescence des cellules induit de nombreux changements transcriptionnels et modifie les niveaux d'expression de nombreux gènes, dont l'*il-6*, l'*il-8* et *mmp3*. Nous avons donc analysé par RT-PCR les niveaux d'expression de certains de ces gènes dans les tumeurs des rats 4 jours après l'injection de l'oxaliplatine ou du sérum physiologique.

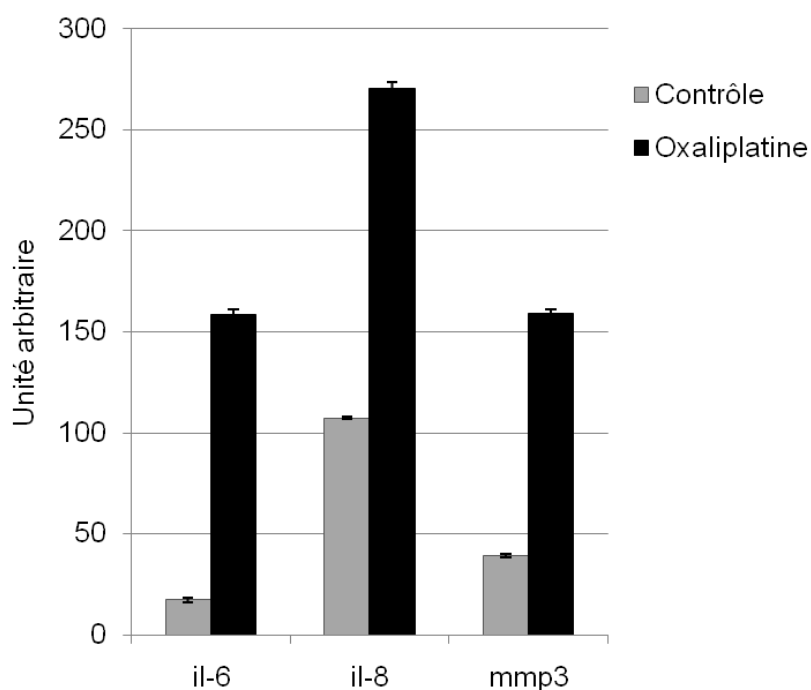


Figure 66 : variation de l'expression des gènes marqueurs de la sénescence *il-6*, *il-8* et *mmp3*. Les tumeurs ont été prélevées 96h après l'injection d'oxaliplatine ou de sérum physiologique (J25) et les ARN totaux ont été extraits. Analyse par densitométrie, représentative de 3 RT-PCR indépendantes, des différences d'expression des gènes *il-6*, *il-8* et *mmp3* par rapport à l'expression du gène de l'*actine* (ImageJ).

En accord avec les résultats présentés précédemment, nous avons mis en évidence une augmentation très importante dès 96h de la transcription des gènes de l'*il-6*, de l'*il-8* et de *mmp3* dans les tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine (figure 66).

Tous ces résultats nous permettent d'affirmer que le traitement des rats par l'oxaliplatine induit l'entrée en sénescence de cellules tumorales au sein des tumeurs.

2. L'oxaliplatine induit la sénescence des cellules tumorales *in vitro*

Nous venons de montrer que le traitement par l'oxaliplatine induit l'entrée en sénescence des cellules tumorales *in vivo*, cependant nous ignorons si l'induction de la sénescence se fait par action direct de l'oxaliplatine sur les cellules tumorales. Pour répondre à cette question nous avons étudié l'effet direct de l'oxaliplatine sur les cellules tumorales *in vitro*. Nous avons décidé de réaliser nos expériences sur deux lignées de cellules cancéreuses coliques en parallèle, la lignée de cancer colique de rats BD IX PROb et celle de cancer colique de souris Balb/C CT26.

a) Mise en évidence de la sénescence des cellules tumorales par la coloration au X-gal

Nous avons traité des cellules PROb et CT26 avec respectivement 10 et 20 μ M d'oxaliplatine pendant 120h puis nous avons fixé les cellules et nous les avons incubées pendant 24h avec une solution de X-gal.

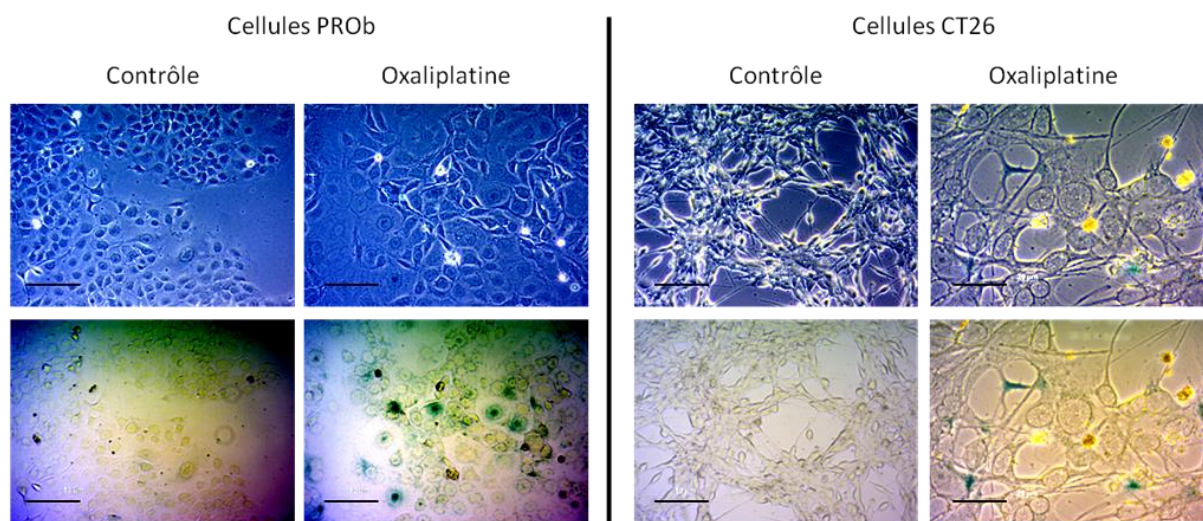


Figure 67 : coloration au X-gal de cellules tumorales sénescents traitées ou non par l'oxaliplatine. Les cellules tumorales ont été traitées ou non avec de l'oxaliplatine pendant 120h (5 jours) puis incubées 24h avec une solution de X-Gal. Les cellules sont ensuite observées en microscopie optique à contraste de phase (haut) pour observer la morphologie cellulaire et en microscopie à lumière polarisée (bas) pour mettre en évidence les précipités bleus dans les cellules sénescents. Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

Lorsque les cellules sont traitées *in vitro* avec de l'oxaliplatine, on observe des changements très importants de leur morphologie (figure 67). Le volume et la taille des cellules augmentent fortement et de nombreuses vacuoles apparaissent dans leur cytoplasme. La coloration par le X-Gal met en évidence la présence de très nombreuses cellules sénescents.

b) Mise en évidence de la sénescence des cellules tumorales par la coloration au DDAO

Après 8 jours de traitement, nous avons réalisé un marquage des cellules sénescences par le DDAO que nous avons analysé par cytométrie en flux.

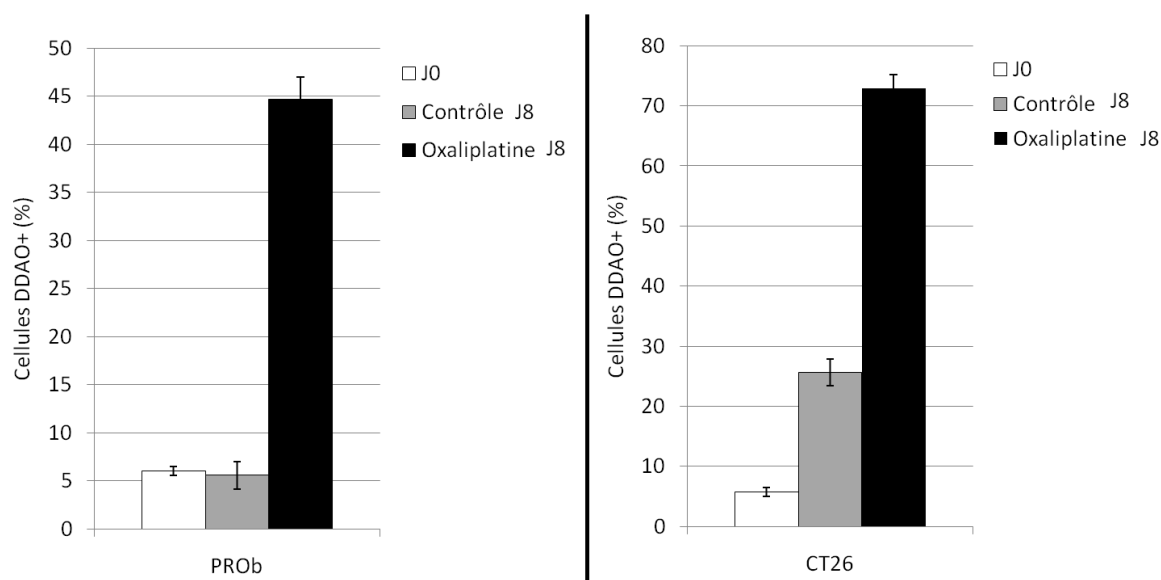


Figure 68 : coloration au DDAO de cellules tumorales traitées ou non par l'oxaliplatine. Les cellules tumorales ont été traitées avec de l'oxaliplatine pendant 8 jours puis incubées 1h avec une solution de coloration de DDAO. Les cellules sont ensuite décrochées puis analysées par cytométrie en flux. Les images sont représentatives de 2 expériences indépendantes.

Nous avons mis en évidence une très forte augmentation de la proportion de cellules sénescences après 8 jours de traitement par l'oxaliplatine (figure 68).

c) Mise en évidence de la sénescence des cellules tumorales par analyse de l'expression de gènes marqueurs

De même que pour l'étude de la sénescence *in vivo*, nous avons analysé par RT-PCR les niveaux d'expression de certains gènes marqueurs de la sénescence dans les cellules tumorales traitées *in vitro* pendant 5 jours par l'oxaliplatine.

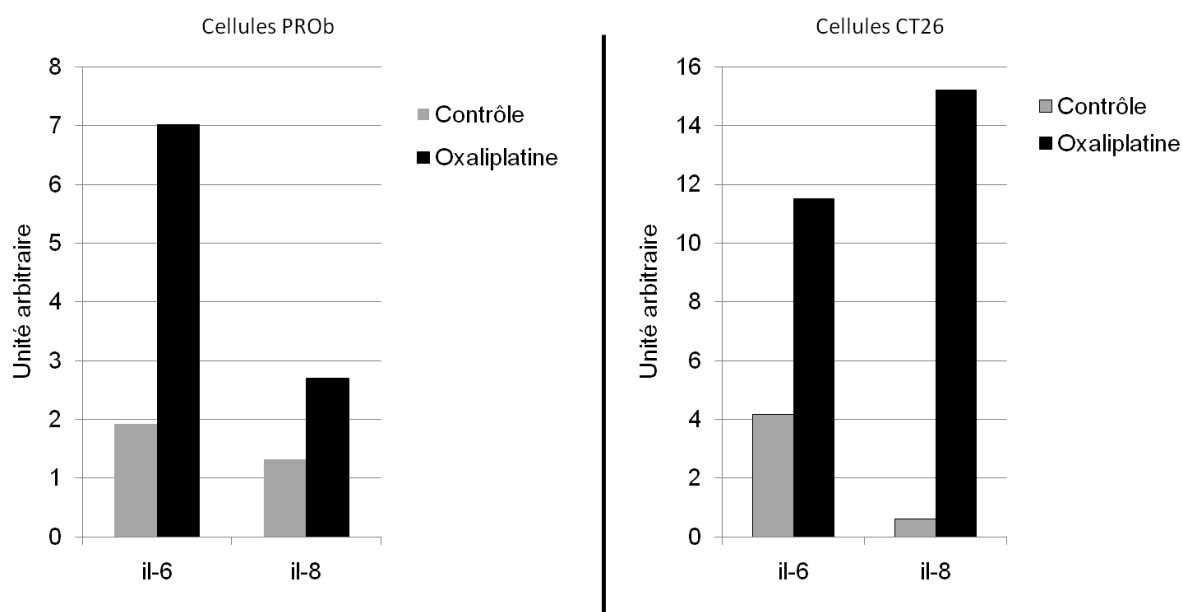


Figure 69 : variation de l'expression des gènes marqueurs de la sénescence *il-6* et *il-8*. Les cellules ont été traitées pendant 120h et les ARN totaux ont été extraits. Analyse par densitométrie, représentative de 3 RT-PCR indépendantes, des différences d'expression des gènes de l'*il-6* et de l'*il-8* par rapport à l'expression du gène de la *gapdh* (ImageJ).

Nous avons mis en évidence une augmentation importante de l'expression des gènes de l'*il-6* et de l'*il-8* en réponse au traitement par l'oxaliplatine (figure 69).

Les résultats présentés dans les figures 67, 68 et 69 confirment que l'oxaliplatine induit de manière directe l'entrée en sénescence *in vitro* des cellules tumorales PROb et CT26.

d) L'oxaliplatine induit la sénescence de nombreuses lignées tumorales

Nous avons montré que l'oxaliplatine induit la sénescence des cellules appartenant à deux lignées cancéreuses coliques. Nous avons cherché à vérifier le caractère général de cette propriété de l'oxaliplatine. Nous avons donc traité pendant 5 jours différentes lignées tumorales coliques humaine (SW480 et HCT116), une lignée tumorale mammaire murine (EMT6H) et une lignée de mélanome murin (B16F10) puis nous les avons colorées avec une solution de X-Gal pendant 24h.

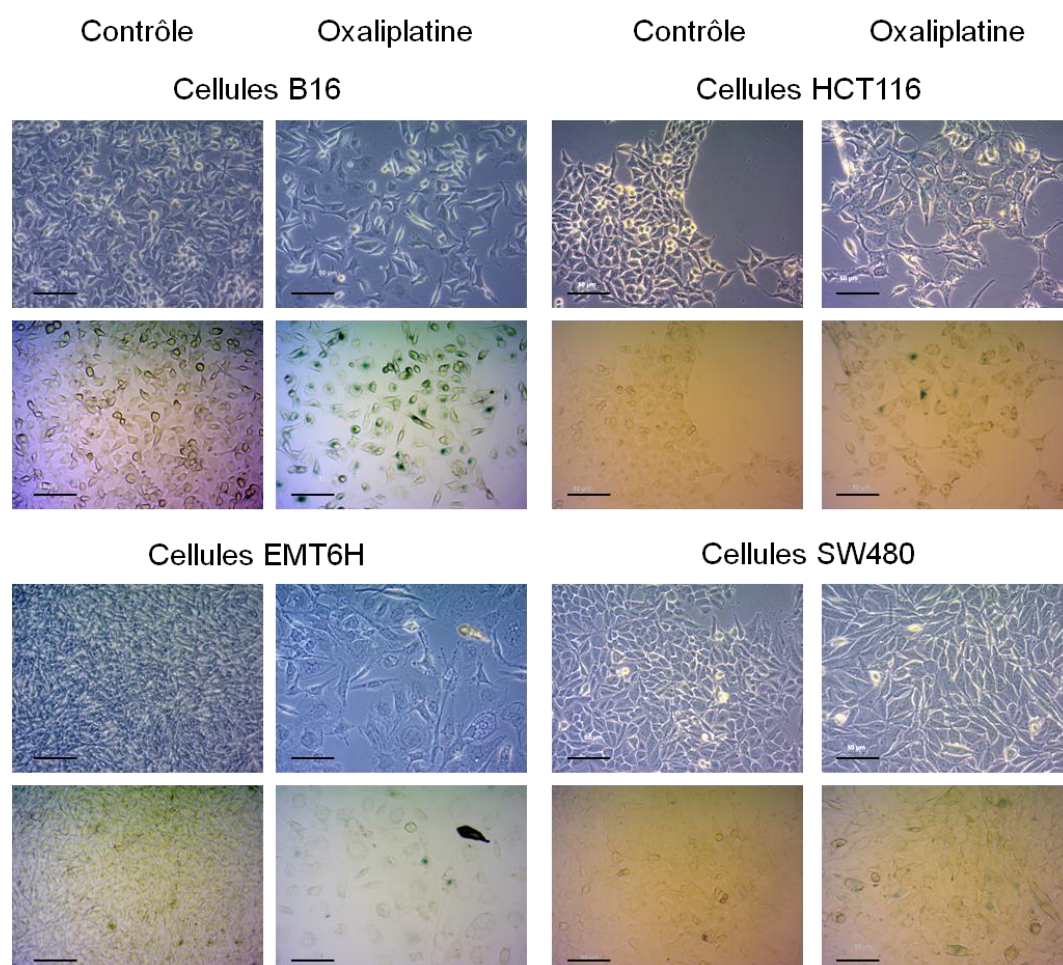


Figure 70 : Coloration au X-gal de cellules tumorales sénescentes traitées ou non par l'oxaliplatine. Les cellules tumorales ont été traitées avec de l'oxaliplatine pendant 120h (5 jours) puis incubées 24h avec une solution de X-Gal. Les cellules sont ensuite observées en microscopie optique à contraste de phase (haut) pour observer la morphologie cellulaire et en microscopie à lumière polarisée (bas) pour mettre en évidence les précipités bleus dans les cellules sénescents.

Comme observé pour les lignées PROb et CT26, lorsque les cellules B16F10, EMT6H, SW480 et HCT116 sont traitées *in vitro* avec de l'oxaliplatine leur taille et leur volume augmentent très fortement et on observe l'apparition de nombreuses vacuoles dans leur cytoplasme (figure 70). De plus, la coloration par le X-Gal met en évidence la présence de nombreuses cellules sénescences.

Ces résultats confirment que l'oxaliplatine peut induire l'entrée en sénescence de très nombreuses lignées tumorales indépendamment du type cellulaire initial.

III. La sénescence et les neutrophiles

Nous avons mis en évidence dans la figure 60 la présence d'un anneau de cellules immunitaires autour des nodules tumoraux dans le modèle de carcinomatoses induites chez le rat BD IX. Nous avons également remarqué une augmentation de l'épaisseur de cet anneau lorsque les rats recevaient un traitement, qu'il s'agisse de la monothérapie par l'oxaliplatine ou le lipide A ou de la combinaison des deux.

D'autre part, dans un article publié en 2007 dans la revue Nature, Xue et ses collègues ont montré que la restauration de l'entrée en sénescence de cellules tumorales induit le recrutement de cellules immunitaires dans des carcinomes hépatiques et la régression des tumeurs (Xue et al., 2007). Nous avons donc cherché si l'induction de la sénescence des cellules tumorales par l'oxaliplatine pouvait moduler le recrutement et / ou l'activation des cellules immunitaires.

Or, nous avons montré dans la première partie des résultats que l'activité antitumorale de l'immunothérapie de petites carcinomatoses par le lipide A est due en partie au recrutement et à l'activation des neutrophiles au sein des tumeurs. Nous avons donc cherché si l'induction de la sénescence des cellules tumorales par l'oxaliplatine influence le recrutement et / ou l'activation des neutrophiles dans les tumeurs, expliquant l'efficacité antitumorale de l'association oxaliplatine / lipide A dans le traitement de carcinomatoses péritonéales avancées.

1. Les cellules sénescents induisent-elles le recrutement des neutrophiles dans les tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine ?

a) Les cellules sénescents expriment-elles les gènes des chimioattractants des neutrophiles *in vitro* ?

Dans un premier temps nous avons recherché *in vitro* par RT-PCR si les cellules tumorales traitées par l'oxaliplatine expriment les transcrits des gènes des chimioattractants des neutrophiles.

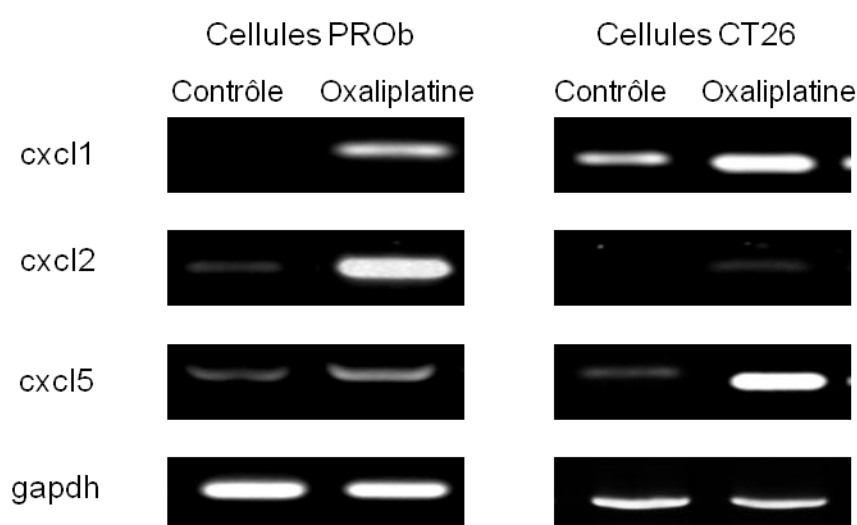


Figure 71 : variation de l'expression des gènes des chimioattractants de neutrophiles dans les cellules tumorales PROb et CT26 traitées ou non par l'oxaliplatine. Les cellules ont été traitées pendant 96h par de l'oxaliplatine et les ARN totaux ont été extraits. Expression des gènes de *cxcl1*, *cxcl2* et *cxcl5* par RT-PCR comparée à l'expression du gène de la *gapdh*. Figure représentative de 3 expériences indépendantes.

Après 96h de traitement par l'oxaliplatine, les cellules tumorales PROb et CT26 expriment plus fortement les gènes des chimioattractants des neutrophiles (*cxcl1*, 2 et 5) que les cellules contrôles (figure 71).

b) La sénescence module-t-elle l'expression et la production des chimioattractants des neutrophiles *in vivo* ?

Nous venons de montrer que les cellules sénescents *in vitro* expriment plus fortement les gènes des chimioattractants des neutrophiles, nous avons donc cherché à valider ces résultats dans les tumeurs en réalisant une RT-PCR.

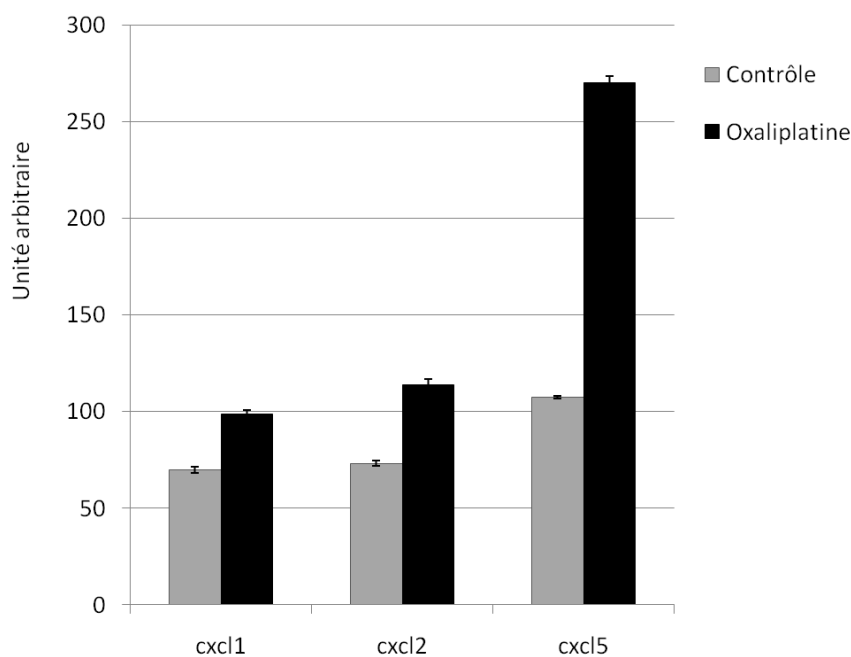


Figure 72 : variation de l'expression des gènes des chimioattractants de neutrophiles. Les tumeurs ont été prélevées 96h après l'injection d'oxaliplatine ou de sérum physiologique (J25) et les ARN totaux ont été extraits. Analyse par densitométrie, représentative de 3 RT-PCR indépendantes, des différences d'expression des gènes *cxcl1*, *cxcl2* et *cxcl5* par rapport à l'expression du gène de l'*actine* (ImageJ).

Comme observé dans les expériences *in vitro*, il y a une augmentation importante des niveaux d'expression des gènes des chimioattractants des neutrophiles dans les tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine (figure 72).

Nous avons alors vérifié si les variations mesurées des taux d'expression des gènes des chimioattractants des neutrophiles étaient traduites au niveau protéique. Pour cela nous avons réalisé des cytokines arrays à partir de lysats de tumeurs et à partir de sera prélevés 8 jours après traitement des rats par l'oxaliplatine.

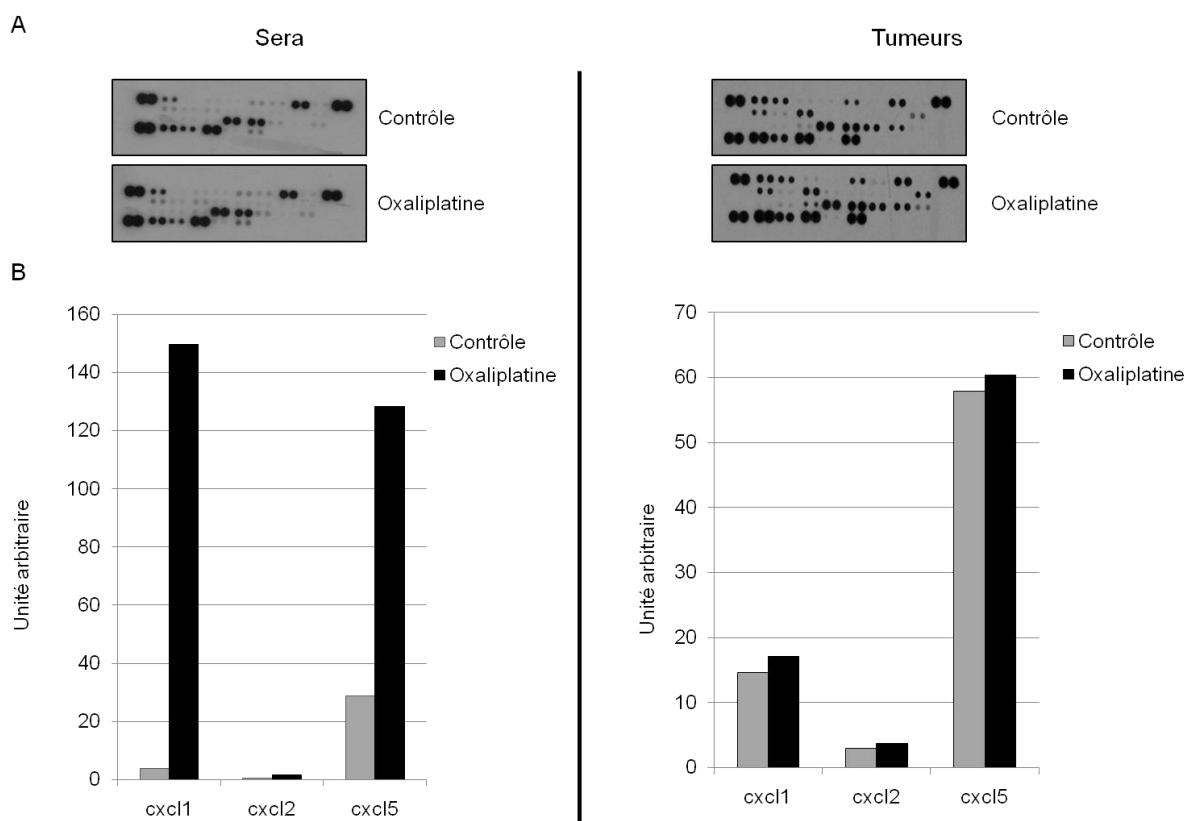


Figure 73 : variations de la quantité des chimioattractants des neutrophiles mesurées par « cytokine antibody arrays ». Les tumeurs et les sera de rats contrôles (gris) ou traités par l'oxaliplatine (noir) ont été prélevées 8 jours après le traitement (J29) et leur contenu en cytokines et chimiokines a été analysé. (A) Immunorévélation des membranes de « cytokine antibody arrays » (B) Quantité relative des chimioattractants des neutrophiles CXCL1, 2 et 5 déterminée avec le logiciel ImageJ, les résultats ont été exprimés en pourcentage par comparaison avec un contrôle interne (100 %).

Comme nous pouvons le voir sur la figure 73, une très forte augmentation de la quantité de CXCL1 et CXCL5 a été mesurée dans le sérum des rats traités par l'oxaliplatine par rapport à celles mesurée chez les rats contrôles. En revanche, l'augmentation de ces chimiokines détectée dans les tumeurs est plus faible.

Nous n'avons pas mis en évidence de variations de la quantité de CXCL2 dans le sérum et dans les tumeurs des rats traités par oxaliplatine par rapport à celles mesurées chez les rats contrôles.

Les résultats présentés dans les figures 72 et 73 montrent que le traitement des rats par l'oxaliplatine pourrait moduler le recrutement des neutrophiles dans les tumeurs du fait de l'augmentation tant de l'expression des gènes que de la quantité des chimioattractants de ces cellules.

c) La sénescence induit-elle le recrutement des neutrophiles dans les tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine ?

L'étape suivante a consisté à vérifier si l'augmentation de la quantité de chimioattractants des neutrophiles mesurée chez les rats traités par l'oxaliplatine était corrélée à l'augmentation du recrutement des neutrophiles au sein des tumeurs. Pour cela nous avons réalisé un marquage immunohistochimique sur des coupes de tumeurs prélevées 24h, 96h et 8 jours après le traitement ou non des rats par l'oxaliplatine.

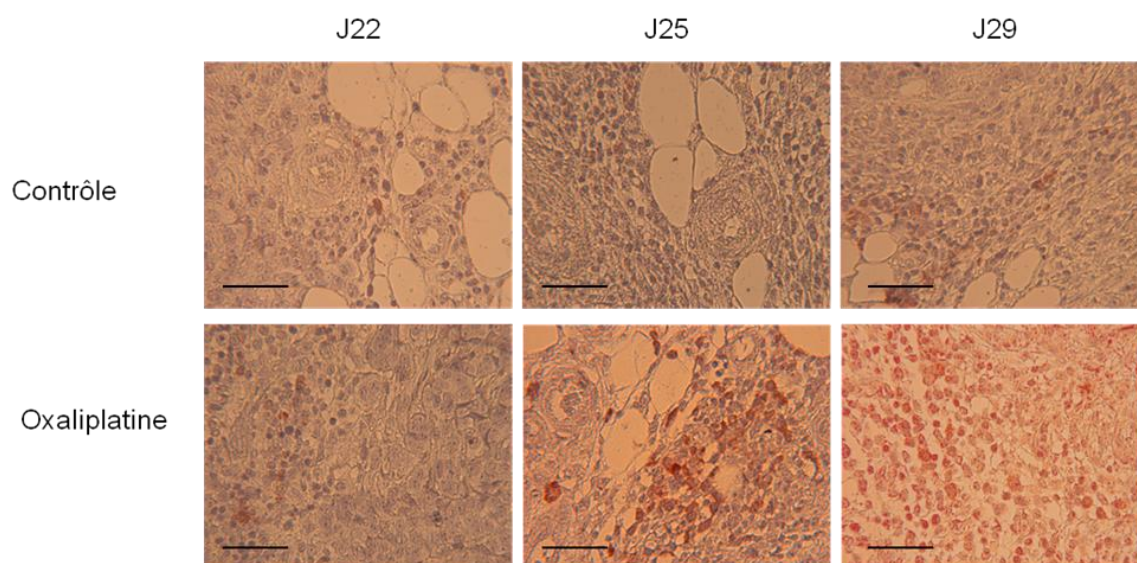


Figure 74 : marquage immunohistochimique des neutrophiles (rouge / brun) au sein de tumeurs de rats traités ou non par l'oxaliplatine. Les tumeurs ont été prélevées 24h (J22), 96h (J25) et 8 jours (J29) après l'injection d'oxaliplatine ou de sérum physiologique, fixées et incluses en paraffine. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et un marquage immunohistochimique a permis de mettre en évidence les neutrophiles à l'aide d'un anticorps anti-HIS48 (rouge / brun). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

A partir de 96h nous avons mis en évidence la présence de nombreux neutrophiles au sein des tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine par rapport aux tumeurs des rats contrôles (figure 74).

Afin de confirmer l'augmentation du recrutement des neutrophiles observée par marquage immunohistochimique, nous avons évalué la présence des neutrophiles dans les tumeurs par RT-PCR. Pour cela nous avons déterminé les niveaux d'expression de deux gènes spécifiquement exprimés par les neutrophiles, *ncf1* et *ncf2*.

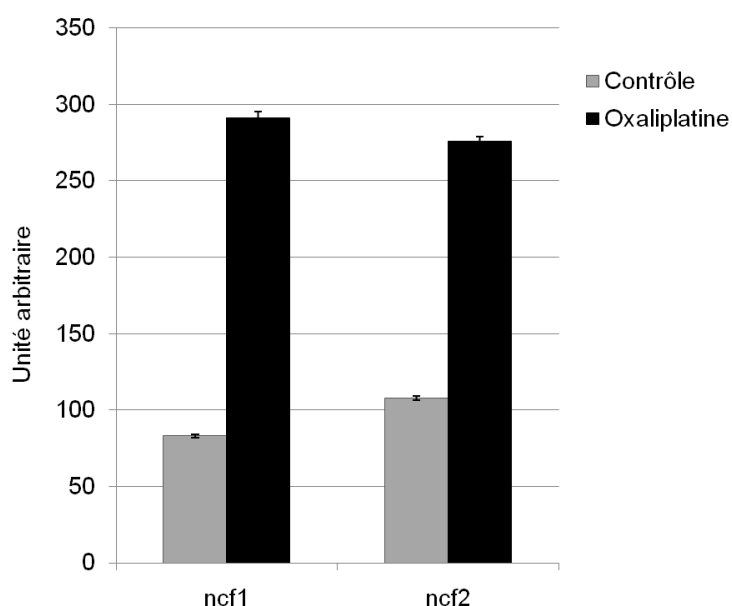


Figure 75 : variation de l'expression des gènes spécifiques des neutrophiles *ncf1* et *ncf2*. Les tumeurs ont été prélevées 96h (J25) après l'injection d'oxaliplatine ou de sérum physiologique et les ARN totaux ont été extraits. Analyse par densitométrie, représentative des différences d'expression des gènes *ncf1* et *ncf2* par rapport à l'expression du gène de la *gapdh* (ImageJ).

Une augmentation importante du niveau d'expression des gènes *ncf1* et *ncf2* a été mise en évidence dans les tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine comparé à ceux relevés dans les tumeurs des rats contrôles (figure 75). Ces résultats confirment ceux présentés à la figure 74, le traitement des rats par l'oxaliplatine induit le recrutement de neutrophiles au sein des tumeurs.

2. Quel est le phénotype des neutrophiles recrutés au sein des tumeurs lorsque les rats sont traités par l'oxaliplatine ?

Nous avons vu précédemment que les neutrophiles peuvent assumer deux phénotypes opposés, N1 anti-tumoraux ou N2 pro-tumorigènes. La distinction entre ces deux populations se fait sur le niveau d'expression de l'arginase 1 et l'expression ou non de l'iNOS, les neutrophiles de type N2 étant $\text{Arg1}^{\text{high}}$ iNOS^- alors que les neutrophiles de type N1 sont Arg1^{low} $\text{iNOS}^{\text{high}}$.

Pour déterminer quelle population de neutrophiles est recrutée au sein des tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine, nous avons réalisé un double marquage immunohistofluorescent des neutrophiles et de l'iNOS sur des coupes de tumeurs prélevées à J29, soit 8 jours après l'injection d'oxaliplatine ou de sérum physiologique aux animaux.

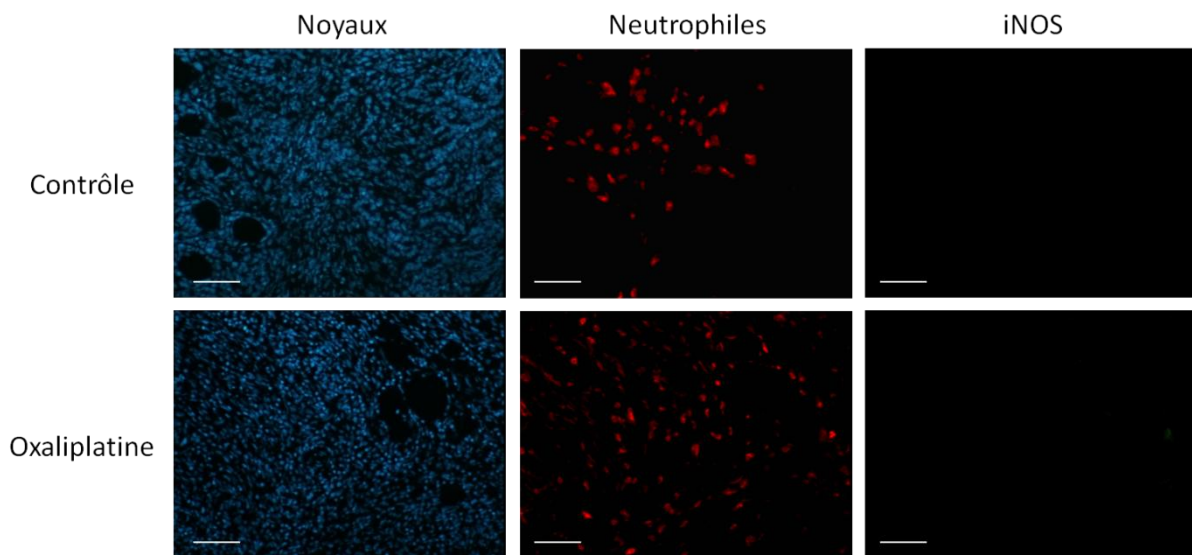


Figure 76 : marquage de l'iNOS exprimée par les neutrophiles dans les tumeurs de rats traités ou non par l'oxaliplatine. Les tumeurs ont été prélevées 8 jours (J29) après l'injection d'oxaliplatine ou de sérum physiologique, fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μm ont été réalisées et un double marquage immunohistofluorescent a permis de mettre en évidence les neutrophiles à l'aide d'un anticorps anti-HIS48 (rouge) et d'un anticorps anti-iNOS (vert). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Nous avons mis en évidence un recrutement plus important des neutrophiles au sein des tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine comparés aux tumeurs des rats contrôles (figure 76). Ces résultats confirment ceux présentés à la figure 74. Cependant, il n'y a pas d'expression de l'iNOS par les neutrophiles, que les rats soient traités par l'oxaliplatine ou non. Nous pouvons

donc conclure que les neutrophiles recrutés au sein des tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine sont de type N2 donc protumorigènes.

Nous avons montré dans la première partie des résultats que le microenvironnement peut moduler l'expression du granzyme B par les neutrophiles. D'autre part, plusieurs études ont établi que les cellules sénescentes sécrètent de nombreuses molécules (protéases, cytokines et chimiokines) qui modifient profondément le microenvironnement tissulaire (Kuilman & Peeper, 2009). C'est pourquoi nous avons recherché si les neutrophiles intratumoraux expriment du granzyme B.

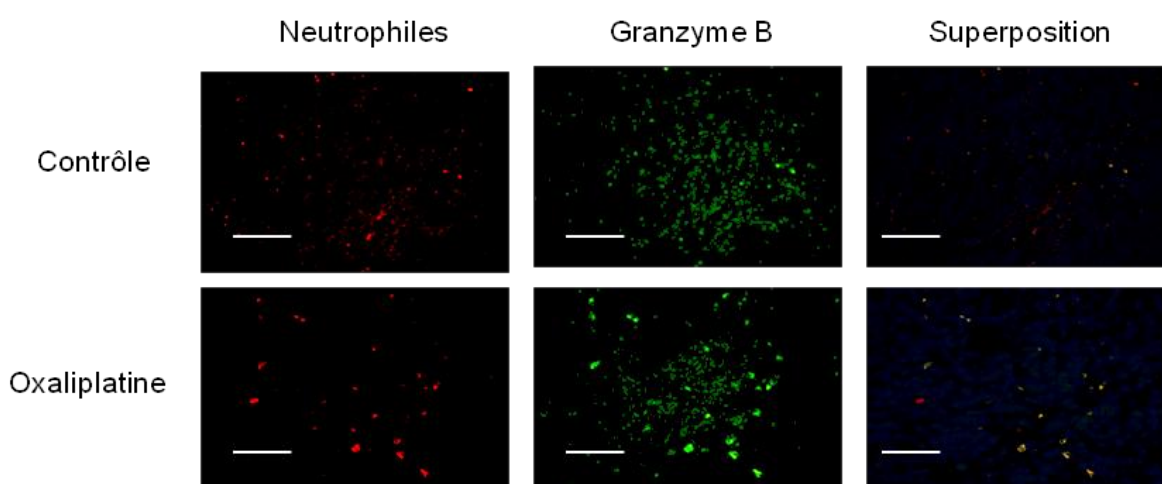


Figure 77 : marquage immunohistofluorescent des neutrophiles et du granzyme B dans les tumeurs de rats traités ou non par l'oxaliplatine. Les tumeurs ont été prélevées 8 jours (J29) après l'injection d'oxaliplatine ou de sérum physiologique, fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et un double marquage immunohistofluorescent a mis en évidence les neutrophiles à l'aide d'un anticorps anti-HIS48 (rouge) et d'un anticorps anti-granzyme B (vert), les noyaux sont visibles en DAPI (bleu). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Nous observons la présence de granzyme B dans les neutrophiles intratumoraux que les rats soient traités ou non par l'oxaliplatine (figure 77). Cependant, il semble qu'un plus grand nombre de neutrophiles expriment le granzyme B dans les tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine par rapport à ceux des rats contrôles.

IV. La sénescence et l'immunothérapie :

1. Le traitement par la combinaison oxaliplatine / lipide A induit la diminution de la quantité de cellules sénescentes :

Les résultats présentés dans les figures 64, 65 et 66 démontrent que le traitement par l'oxaliplatine induit l'entrée en sénescence des cellules tumorales. D'autre part, nous avons montré dans la figure 60 que la combinaison de traitement oxaliplatine / lipide A diminue la quantité de cellules tumorales au sein des tumeurs par rapport aux tumeurs des rats traités par les monothérapies et contrôles. Afin de savoir si l'association de l'oxaliplatine avec l'immunothérapie par le lipide A modifie la quantité de cellules sénescentes dans les tumeurs, nous avons réalisé une coloration au X-gal des tumeurs des rats traités ou non.

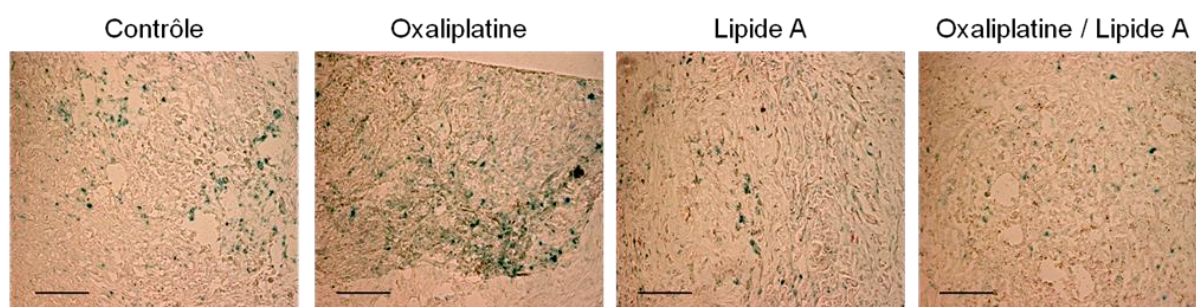


Figure 78 : coloration au X-gal des cellules sénescentes dans les tumeurs de rats traités ou non. Les tumeurs ont été prélevées 24h après l'injection de lipide A (J29), fixées et incluses. Des coupes de 5 µm ont été réalisées et les cellules sénescentes ont été mises en évidence par une coloration au X-Gal (bleue), les noyaux des cellules ont été colorés au nuclear fast red (rose). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Comme nous l'avons montré à la figure 64, le traitement des rats par l'oxaliplatine induit une augmentation très importante du nombre de cellules sénescentes dans les tumeurs par rapport aux tumeurs des rats contrôles (figure 78). A l'inverse, l'immunothérapie par le lipide A seul n'induit aucune augmentation de la quantité de cellules sénescentes dans les tumeurs des rats traités. De manière surprenante, la combinaison de traitement oxaliplatine / lipide A n'induit pas non plus d'augmentation de la quantité de cellules sénescentes dans les tumeurs.

Dans la figure 63 nous avons montré une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales dans les tumeurs des rats traités par la combinaison par rapport aux autres groupes.

Nous avons donc émis l'hypothèse que le traitement par le lipide A induit la mort par apoptose des cellules sénescents.

2. Les neutrophiles peuvent-ils être impliqués dans l'efficacité antitumorale de la combinaison oxaliplatine / lipide A ?

Nous avons montré que l'induction de la sénescence des cellules tumorales par l'oxaliplatine induit le recrutement au sein des tumeurs de neutrophiles (figure 74) de type N1 (figure 76). De plus nous avons décrit dans la première partie des mes travaux de thèse un mécanisme d'élimination des cellules tumorales par le granzyme B sécrété par les neutrophiles de type N2 présents en masse au sein des tumeurs lorsque les rats sont traités par le lipide A.

Nous avons donc décidé d'étudier l'effet de la combinaison oxaliplatine / lipide A sur le recrutement des neutrophiles dans les tumeurs.

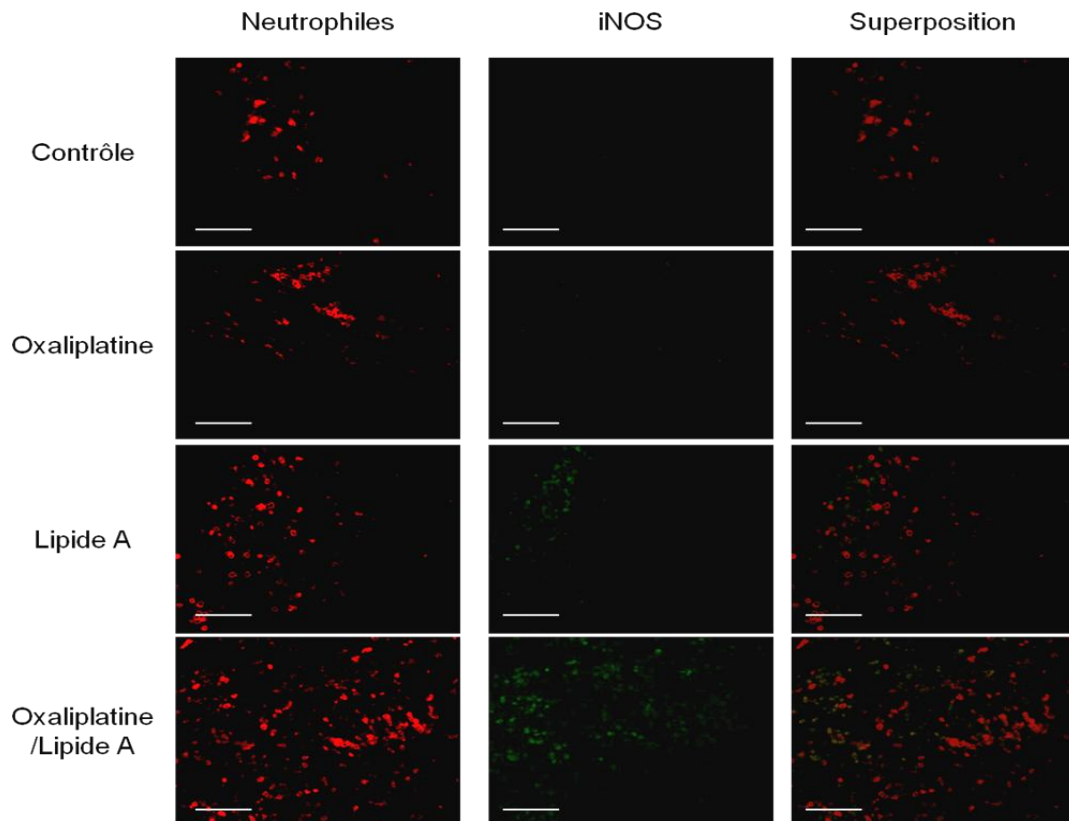


Figure 79 : marquage de l'iNOS exprimées par les neutrophiles dans les tumeurs de rats traités ou non. Les tumeurs ont été prélevées à J29, fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et un double marquage immunohistofluorescent a permis de mettre en évidence les neutrophiles à l'aide d'un anticorps anti-HIS48 (rouge) et d'un anticorps anti-iNOS (vert). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Nous avons mis en évidence un recrutement plus important des neutrophiles au sein des tumeurs des rats traités par la combinaison oxaliplatine / lipide A comparé au marquage observé dans les tumeurs des rats des autres groupes (figure 79). De plus, nous observons que le traitement par le lipide A, seul et associé à l'oxaliplatine, induit l'expression de l'iNOS par certains neutrophiles. Nous en avons conclu que les neutrophiles recrutés au sein des tumeurs des rats traités par le lipide A, seul ou associé à l'oxaliplatine, sont de type N1 donc antitumoraux.

Puisque nous avons montré le recrutement de neutrophiles de type N1 dans les tumeurs des rats traités par la combinaison oxaliplatine / lipide A, nous avons poursuivi notre étude en recherchant si ces cellules expriment du granzyme B.

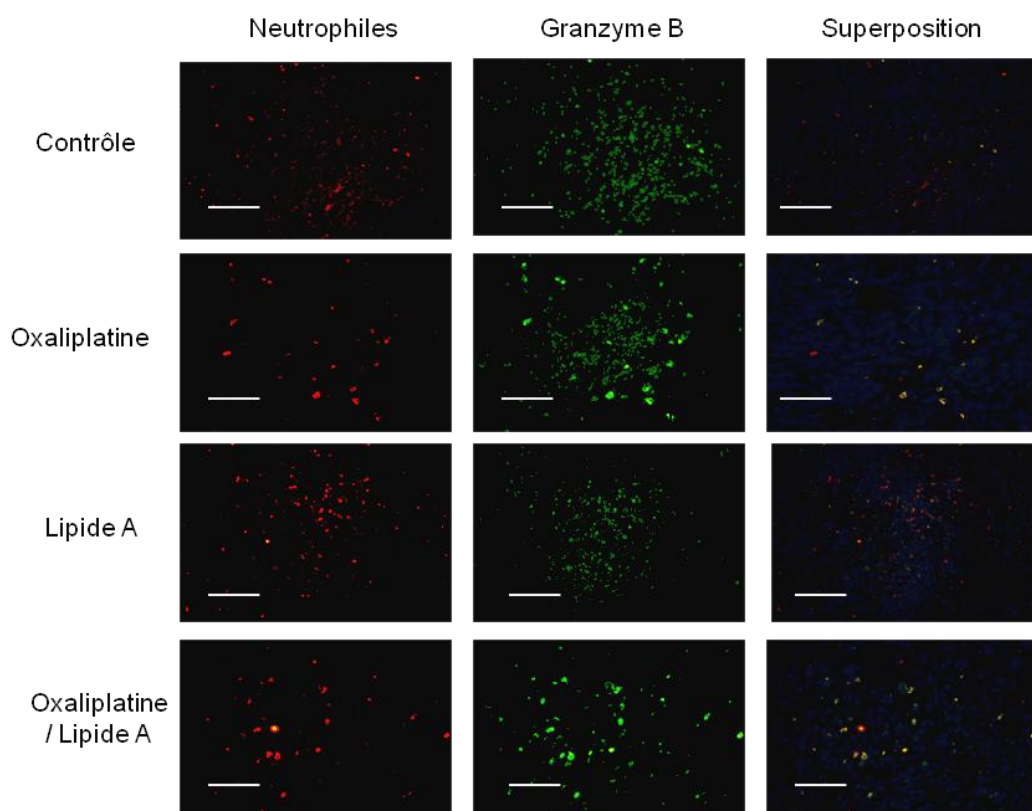


Figure 80 : marquage immunohistofluorescent des neutrophiles et du granzyme B dans les tumeurs de rats traités ou non. Les tumeurs ont été prélevées à J29, fixées et incluses en OCT. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et un double marquage immunohistofluorescent a mis en évidence les neutrophiles à l'aide d'un anticorps anti-HIS48 (rouge) et le granzyme B (vert), les noyaux sont visibles en DAPI (bleu). Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec 3 rats par groupes.

Nous observons la présence de granzyme B dans les neutrophiles intratumoraux des rats quelque soit le traitement qu'ils reçoivent (figure 80). Comme nous l'avons observé dans la figure 77, le marquage du granzyme B est plus fort lorsque les rats sont traités par l'oxaliplatine, qu'il soit associé ou non au lipide A.

Les résultats présentés dans les figures 79 et 80 ont mis en évidence le recrutement au sein des tumeurs des rats traités par la combinaison oxaliplatine / lipide A d'une importante population de neutrophiles de type N1 exprimant du granzyme B. Nous avons également montré la présence de nombreuses cellules tumorales apoptotiques dans les tumeurs de ces mêmes animaux (figure 63) et la diminution de la quantité de cellules apoptotiques par rapports aux rats traités par l'oxaliplatine seul (figure 78). Fort de ces résultats et des données présentées dans la première partie de mes travaux de thèse, nous avons émis l'hypothèse que

l'entrée en sénescence des cellules tumorales après traitement par l'oxaliplatine est responsable, du moins en partie, de l'effet antitumoral de la synergie oxaliplatine / lipide A. En effet, l'induction de la sénescence des cellules tumorales par l'oxaliplatine augmente le recrutement des neutrophiles dans les tumeurs, semble favoriser la production de granzyme B par ces cellules et pourrait augmenter la réponse antitumorale des cellules immunitaires induite par le lipide A, dirigée notamment contre les cellules sénescents.

Discussion & Perspectives

Les cellules à l'origine de tumeurs ont acquis de nombreuses transformations leur permettant d'échapper aux différents systèmes de contrôle développés par l'organisme pour prévenir l'apparition de cancer. Certaines de ces transformations sont propres aux cellules elles-mêmes, notamment leur capacité à proliférer indéfiniment et de manière soutenue même en présence d'inhibiteurs de croissance. Mais les cellules tumorales vont également induire des modifications de leur microenvironnement afin qu'il soutienne leur prolifération, notamment en induisant le développement de vaisseaux sanguins nécessaires à l'apport en oxygène et en nutriments indispensables à la multiplication des cellules. Elles vont également libérer de nombreuses molécules à l'origine d'une inflammation chronique leur permettant d'éteindre la réponse immunitaire antitumorale.

En effet, les cellules tumorales sécrètent différentes cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10, l'IL-17 ou le TGF β qui favorisent le développement de populations de cellules immunitaires immunosuppressives. Ainsi, les tumeurs sont colonisées par des macrophages de type M2, des cellules myéloïdes immunosuppressives et des lymphocytes T régulateurs qui vont inhiber l'activation d'une réponse immunitaire antitumorale efficace et favoriser la croissance des cellules tumorales en produisant des facteurs de croissance et en permettant le développement de néovaisseaux (Linnebacher et al., 2012).

Cependant, ces cellules immunitaires immunosuppressives présentes dans le microenvironnement tumoral peuvent être une arme à double tranchant pour les cellules tumorales. En effet, l'utilisation d'activateurs puissants du système immunitaire tels que des cytokines (IL-2, IL-12 et IFN γ) peut induire leur reprogrammation et stimuler le développement d'une réponse immunitaire antitumorale efficace. Parmi les différents activateurs connus du système immunitaire, les dérivés bactériens ont été utilisés depuis plus d'un siècle dans le traitement de nombreux cancers. En effet, ils sont à l'origine d'une inflammation aiguë qui favorise la rémission des tumeurs notamment en éliminant les cellules immunosuppressives et en bloquant la production de cytokines de type Th2. D'autre part, les dérivés bactériens activent les cellules présentatrices des antigènes, lesquelles vont sécréter des cytokines de type Th1, induire le recrutement dans les tumeurs de lymphocytes T cytotoxiques et de neutrophiles et enfin en favoriser le développement d'une réponse immunitaire mémoire.

Actuellement, le plus grand succès de l'immunothérapie est l'utilisation du bacille de Calmette-Guérin dans le traitement des cancers de la vessie (Rosevear et al., 2009).

Développées en 1976 par Morales, les instillations de BCG aux patients induisent la production de cytokines inflammatoires, l'induction d'une réponse immunitaire de type Th1 et le recrutement de neutrophiles au sein des tumeurs.

Les neutrophiles représentent une proportion significative des cellules inflammatoires infiltrant les tumeurs, notamment du fait de la sécrétion de chimioattractants par les cellules tumorales (Fridlender & Albelda, 2012). Leur présence est souvent associée à un mauvais pronostic pour les patients (Donskov, 2013), notamment à cause de leur capacité à favoriser la croissance des cellules tumorales (Houghton et al., 2010), l'angiogénèse (Kuang et al., 2011; Queen et al., 2005) et la formation de métastases. Cependant des études récentes ont montré que les neutrophiles peuvent présenter des phénotypes opposés en fonction du microenvironnement dans lequel ils sont recrutés (Fridlender et al., 2009). Ainsi en 2011, Souto synthétise la littérature biomédicale des 40 dernières années et met en évidence le rôle antitumoral important des neutrophiles lorsque des modifications du microenvironnement induisent le développement d'une inflammation aigüe (Souto, Vila & Brú, 2011).

Dans nos études portant sur les mécanismes d'action de l'immunothérapie par le lipide A, nous avons mis en évidence l'importance des neutrophiles dans l'effet antitumoral du traitement. En effet, nous avons montré que le lipide A induit le recrutement de nombreux neutrophiles de type N1 dans les tumeurs et que l'inhibition du recrutement de ces cellules est à l'origine d'une diminution de l'efficacité du traitement par le lipide A. D'autre part, le traitement des neutrophiles par le lipide A induit la libération de granzyme B responsable de l'apoptose des cellules tumorales.

Cependant, nous ignorons par quels mécanismes le lipide A induit le recrutement et l'activation des neutrophiles. Nous savons que les neutrophiles expriment à leur membrane le récepteur des lipides A, TLR4, dont l'activation influence le recrutement des neutrophiles aux sites inflammatoires, la production d'espèces réactives de l'oxygène et la libération de cytokines et de chimiokines. De plus, la stimulation de TLR4 active la voie de signalisation de NF- κ B, laquelle permet la production de nombreuses molécules proinflammatoires, et augmente la durée de vie des neutrophiles (Parker et al., 2005; Sabroe, Dower & Whyte, 2005a; Sabroe et al., 2005b). Il serait donc intéressant de vérifier si l'utilisation d'un autre

agoniste de TLR4 induit également le recrutement, l'activation et la production de granzyme B par les neutrophiles.

Nous avons montré que les neutrophiles recrutés au sein des tumeurs des rats traités par le lipide A sont de type N1, c'est-à-dire qu'ils expriment faiblement l'arginase 1 et fortement l'iNOS (Arg1^{low} , $\text{iNOS}^{\text{high}}$), alors que ceux observés en périphérie des tumeurs des rats contrôles sont de type N2 ($\text{Arg1}^{\text{high}}$, iNOS^-). Nous ignorons si le traitement des animaux par le lipide A induit un changement de phénotype des neutrophiles N2 déjà présents cependant nous savons que le traitement induit un fort recrutement de ces cellules dans les tumeurs. Nous nous sommes donc demandés si les neutrophiles étaient activés *in situ* ou bien si l'induction du phénotype antitumoral se produisait en amont du recrutement dans les tumeurs. Des données non présentées nous amènent à penser que l'activation des neutrophiles a lieu dès la moelle osseuse. En effet, la caractérisation de neutrophiles isolés de la moelle osseuse de rats porteurs de tumeurs traités par le lipide A met en évidence la présence de cellules présentant un phénotype Arg1^{low} , iNOS^+ à la différence des neutrophiles isolés des rats contrôles qui sont $\text{Arg1}^{\text{high}}$ iNOS^- . Les mêmes résultats ont été trouvés lors de l'étude des neutrophiles circulants et spléniques.

En revanche, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence la production de granzyme B par les neutrophiles issus de ces différents compartiments. Il semble que le microenvironnement cellulaire et/ou moléculaire de la tumeur soit nécessaire pour induire l'expression de granzyme B par ces cellules. Ces données apportent un éclairage intéressant sur la controverse qui a éclaté en 2004 concernant l'expression de granzyme B par les neutrophiles. En effet, dans une étude publiée dans la revue *Blood* en 2004, Wagner montre que les neutrophiles circulants isolés de donneurs sains expriment le granzyme B, ce que réfutent deux différentes équipes, attribuant ces résultats à des faux positifs dus à des contaminations par d'autres cellules (Grossman & Ley, 2004; Metkar & Froelich, 2004; Wagner et al., 2004). Wagner conteste leurs conclusions et propose que l'absence de détection de granzyme B dans les neutrophiles circulants mise en évidence par ces deux équipes soit due à l'activation et à la dégranulation des neutrophiles induite par la technique d'isolement utilisée. En 2008, il confirme l'expression du granzyme B par les neutrophiles dérivés de cellules souches hématopoïétiques CD34^+ et dans les lignées tumorales myéloïdes HL60 et U937 (Wagner et al., 2008). Toutes ces études n'ont portées que sur les neutrophiles

circulants ou dérivé de cellules souches *in vitro*, aucune n'a porté sur les neutrophiles recrutés lors d'une infection ou dans les tumeurs. Nous avons montré pour la première fois que les neutrophiles intratumoraux expriment du granzyme B et que cette expression est tissu spécifique.

De futurs travaux devront explorer les mécanismes responsables de l'expression de cette protéase par les neutrophiles néanmoins nous avons déjà apporté de premiers éléments de réponse. En effet, nous avons montré que les cytokines IL-2, IL-12, IL-21 et IFN γ induisent l'expression et la libération de granzyme B par ces cellules mais nous n'avons pas étudié le rôle de chacune de ces cytokines isolément à l'exception de l'interféron gamma. Nous avons démontré qu'il induit la production et la libération de granzyme B par les neutrophiles. Ces données sont en accords avec celles publiées par Wagner qui a mis en évidence une augmentation de l'expression du gène du *granzyme B* dans les neutrophiles cultivés avec de l'IFN γ (Wagner et al., 2004). De plus, il observe une diminution de la quantité de granzyme B dans les cellules après 24h de traitement et propose qu'elle soit due à l'induction de sa sécrétion par l'IFN γ .

Dans notre étude, les différences d'expression des gènes de l'*il-2*, de l'*il-12* et de l'*il-21* observées entre les tumeurs et les rates des animaux contrôles et traités ouvrent quelques pistes de réflexion. En effet, l'absence de différence significative du niveau d'expression de l'IL-21 entre les tumeurs et les rates des animaux traités et contrôles semble exclure l'implication de cette cytokine seule dans l'induction de la production de granzyme B par les neutrophiles. En revanche, chez les animaux contrôles, nous observons une expression plus importante du gène de l'*il-2* dans les tumeurs et du gène de l'*il-12* dans la rate. Lorsque les animaux sont traités par le lipide A, le niveau d'expression de l'*il-2* dans la rate augmente et n'est plus significativement différent de celui mesuré dans les tumeurs. Inversement, celui de l'*il-12* dans la rate diminue et devient similaire à celui des tumeurs, nous observons alors la production de granzyme B par les neutrophiles spléniques. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'un niveau important d'IL-2 favoriserait l'expression de granzyme B par les neutrophiles alors qu'un niveau élevé d'IL-12 tendrait à l'inhiber. Il ne s'agit bien évidemment que d'hypothèses qui devront être confirmées ou infirmées par l'expérience. Puisque le traitement par le lipide A modifie le microenvironnement spléniques et permet la production de granzyme B par les neutrophiles, il serait intéressant de vérifier le phénotype de ces cellules lors d'une infection bactérienne, tant au site infectieux que dans la rate par

exemple. En effet, en cas d'infection bactérienne il y a lyse des pathogènes et libération d'agonistes des TLRs, il est donc possible que cela induise la production de granzyme B par les neutrophiles, confirmant l'importance du microenvironnement dans cette production. Ces données pourraient apporter des réponses à la controverse sur la production ou non de granzyme B par les neutrophiles.

En outre, nous ignorons de quelle façon le lipide A influence l'expression de l'IL-2 et de l'IL-12, s'il s'agit d'un effet direct *in situ* dans les tumeurs et dans la rate de manière indépendante ou bien s'il s'agit d'un effet indirect, c'est-à-dire que les modifications induites dans un site, les tumeurs par exemple, influencent les modifications d'expression observées sur l'autre site, dans ce cas la rate. En effet, des données du laboratoire semblent indiquer qu'il est nécessaire que les neutrophiles spléniques et de la moelle osseuse soient isolés de rats porteurs de tumeurs pour que le traitement par les cytokines induise l'expression de granzyme B par ces cellules. Ces données suggèrent que les tumeurs produisent et libèrent dans la circulation des molécules capables d'influencer le phénotype des neutrophiles présents dans d'autres organes, hypothèse en accord avec des résultats publiés par Granot et López-Lago (Granot et al., 2011; López-Lago et al., 2013). En effet, ces chercheurs ont montré que la sécrétion de cytokines par les cellules tumorales induit le recrutement de neutrophiles dans les poumons où ils inhibent la formation de métastases.

La modulation des neutrophiles intratumoraux par les facteurs sécrétés par les tumeurs est un mécanisme important développé par les cellules tumorales pour échapper au système immunitaire. En effet, les neutrophiles ont longtemps été déconsidérés, ils étaient vus comme des cellules très efficaces dans la résolution d'infection, notamment en phagocytant et détruisant les pathogènes ainsi qu'en induisant une forte inflammation, mais n'interagissant pas avec les autres cellules immunitaires. Cette vision erronée a fortement évolué depuis quelques années et l'on sait maintenant que les neutrophiles jouent un rôle très important dans l'activation et la régulation des cellules de l'immunité innée et acquise (Kumar & Sharma, 2010; Mantovani et al., 2011; Nathan, 2006). Une fois activés les neutrophiles libèrent de nombreuses cytokines et chimiokines qui vont induire le recrutement et l'activation d'autres cellules immunitaires.

Ainsi, la libération des protéines contenues dans les granules des neutrophiles induit l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et leur extravasation. Elles sont

également responsables de l'activation des macrophages et de l'augmentation de leur capacité à phagocyter (Soehnlein et al., 2009).

D'autres part, la sécrétion de molécules regroupées sous le terme d'« alarmins » (α -defensins, cathelicidin, lactoferrin) induit la maturation des cellules dendritiques immatures, lesquelles vont capturer des antigènes produits notamment par la lyse des cellules par les neutrophiles et induire une réponse immunitaire adaptative (Yang et al., 2009).

Les neutrophiles sécrètent également des chimioattractants des lymphocytes Th1 et Th17 (CCL2, CCL20, CXCL9 et CXCL10) lesquels produisent de l'IFN γ , du TNF α , du GM-CSF et des chimioattractants des neutrophiles qui augmentent le recrutement, l'activation et la durée de vie de ces cellules. De plus, des travaux récents ont montré que les neutrophiles sont capables de présenter des antigènes aux cellules T CD8 $^{+}$ naïves et d'induire leur activation en lymphocytes T cytotoxiques (Mantovani et al., 2011; Müller et al., 2009).

Enfin, la production d'espèces réactives de l'oxygène, de prostaglandines et la libération de composants des granules par les neutrophiles module la survie, la prolifération, l'activité cytotoxique et la libération d'IFN γ par les cellules NK (Jaeger et al., 2012; Mantovani et al., 2011).

On le voit, les neutrophiles sont de véritables chefs d'orchestre de la réponse immunitaire. Leur recrutement rapide et leur très grande plasticité permettent à ces cellules de jouer un rôle central dans le recrutement et l'activation des autres cellules de l'immunité. De plus, nous avons montré que les modifications du microenvironnement tumoral influencent fortement le devenir de ces cellules, c'est pourquoi le développement de recherches visant à modifier le microenvironnement pour induire le recrutement et l'activation des neutrophiles doit être encouragé.

L'induction de la sénescence est une des approches envisageable. En effet, les cellules sénescents libèrent dans le microenvironnement de nombreuses molécules (facteurs de croissance, cytokines, chimiokines et protéases) qui vont le modifier et influencer fortement le recrutement et l'activation des cellules immunitaires (Freund et al., 2010; Kuilman & Peeper, 2009; Xue et al., 2007). Actuellement, de nombreuses causes ont été décrites comme pouvant induire l'entrée prématurée en sénescence des cellules tumorales dont les radiations et plusieurs molécules utilisées en chimiothérapie et notamment le cisplatine (Gewirtz et al., 2008). Le cisplatine induit des dommages à l'ADN responsables de l'apoptose des cellules.

Lorsque les dommages ne sont pas suffisamment importants, les cellules peuvent échapper à la mort et entrer en sénescence.

L'immunothérapie seule n'est pas suffisante pour guérir les rats dont les tumeurs sont très volumineuses. En effet, dans un modèle de carcinomatoses avancées chez le rats, seul 40% des animaux sont guéris par le lipide A. Cependant, nous avons montré qu'une injection préalable de cisplatine permet de maintenir l'efficacité de l'immunothérapie par le lipide A (données non publiées). Nous avons également montré que le remplacement du cisplatine par de l'oxaliplatine ne modifie pas l'efficacité de la combinaison. De plus, l'ordre d'administration des traitements est important. En effet, l'inversion des injections (d'abord le lipide A puis ensuite le cisplatine ou l'oxaliplatine) n'induit aucune augmentation de l'efficacité du traitement. L'oxaliplatine est une molécule de référence dans le traitement des cancers colorectaux, c'est pourquoi nous avons étudié les mécanismes d'action de la combinaison oxaliplatine / lipide A. Le cisplatine étant décrit comme un possible inducteur de la sénescence, nous avons recherché si l'oxaliplatine partageait cette propriété.

Nous avons montré que l'oxaliplatine induit de manière directe l'entrée en sénescence des cellules tumorales, cependant le mécanisme sous-jacent nous échappe encore. Tout comme le cisplatine, l'oxaliplatine agit par formation d'adduits sur les molécules d'ADN, lesquels vont provoquer des cassures doubles brins. Ces cassures vont activer les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN ainsi que la phosphorylation de la protéine p53 et de l'histone H2AX (Chiu et al., 2009) dont le rôle dans le développement de la sénescence a été mis en évidence depuis plusieurs années (Chang et al., 2002; Mirzayans et al., 2005). Néanmoins il est possible que d'autres mécanismes soient impliqués dans l'induction de la sénescence par l'oxaliplatine.

En effet, l'oxaliplatine est métabolisé en DACH et oxalate, lequel est un chélateur puissant des ions calcium. Dans une étude publiée en 2009, Sakurai a montré que la chélation du calcium intracellulaire par l'oxalate est responsable en partie des effets secondaires neurologiques du traitement par l'oxaliplatine (Sakurai et al., 2009). Dans la cellule, le calcium est principalement stocké dans le réticulum endoplasmique (RE) où il est fixé par différentes protéines telles que la calréticuline (Krause & Michalak, 1997). Or, en 2007, Obeid a montré que l'oxaliplatine induit la relocalisation de la calréticuline à la membrane plasmique des cellules (Obeid et al., 2007). Le mécanisme exact de ce phénomène n'est pas

encore totalement décrit néanmoins l'implication d'un efflux calcique du réticulum endoplasmique au cytoplasme a été mis en évidence (Tufi et al., 2008), lequel induirait l'activation d'un mécanisme de stress du RE (Panaretakis et al., 2009) appelé UPR (Unfolded Protein Response) (Schröder & Kaufman, 2005). L'activation prolongée de ce processus est à l'origine de la formation de ROS (Santos et al., 2009) qui peuvent être responsables de l'entrée en sénescence des cellules (Ben-Porath & Weinberg, 2005; Kuilman et al., 2010). La production de ROS peut également être induite par la génération par l'oxaliplatine de disfonctionnement des mitochondries (Passos et al., 2007), notamment par la diminution du potentiel transmembranaire (Gourdier et al., 2004). L'utilisation d'inhibiteurs des canaux calciques telle que la thapsigargine nous permettra de confirmer ou d'infirmer l'implication d'un stress calcique dans les mécanismes d'induction de la sénescence par l'oxaliplatine. De même, l'utilisation de molécules antioxydantes telles que la N-acétyl-cystéine nous permettra d'étudier le rôle des espèces réactives de l'oxygène.

Nous avons fait l'hypothèse que c'est par l'induction de la sénescence des cellules tumorales que l'oxaliplatine augmente l'efficacité de l'immunothérapie par le lipide A. Afin de confirmer cette hypothèse, des expériences sont en cours dans lesquelles nous allons bloquer la sénescence des cellules tumorales en inhibant l'expression du récepteur CXCR2. En effet, Acosta a montré que l'inhibition de l'expression du récepteur CXCR2 permet de diminuer l'entrée en sénescence des cellules (Acosta et al., 2008a).

L'induction de la sénescence des cellules tumorales par l'oxaliplatine induit d'importantes modifications du microenvironnement tumoral. En effet, nous avons mis en évidence une augmentation significative de la concentration des cytokines inflammatoires IL-1 β , TNF α et IFN γ (annexe 4) et de l'expression des gènes de l'*il-6* et de l'*il-8*. Ces cytokines vont participer au développement d'une inflammation chronique dans les tumeurs. D'autre part l'expression des chimioattractants des neutrophiles *cxc11* et *cxc12* est également augmentée dans les tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine où nous avons montré une augmentation du recrutement des neutrophiles. Ces neutrophiles sont de type N2, ce qui est cohérent avec un microenvironnement inflammatoire chronique, cependant il semble qu'un plus grand nombre de neutrophiles intratumoraux expriment le granzyme B par rapport à ceux observés chez les animaux contrôles. Cela s'explique peut être par l'augmentation de la concentration de l'IFN γ néanmoins, il serait intéressant de déterminer les niveaux d'expression des gènes de l'*il-2* et

de l'*il-12*. De plus, une analyse génomique a permis de mettre en évidence une diminution de l'expression du gène *spi-6* dans les tumeurs des rats traités par l'oxaliplatine. Nous l'avons vu, la protéine SPI-6 est l'homologue murin de la protéine humaine PI-9 qui est l'inhibiteur du granzyme B. En outre nous avons montré que les neutrophiles présents dans les tumeurs des rats traités par la combinaison oxaliplatine / lipide A sont de type N1. Il est donc possible que l'augmentation de l'efficacité antitumorale de la combinaison soit due en partie à la libération d'une quantité plus importante de granzyme B par les neutrophiles et à une plus grande sensibilité des cellules tumorales. Cette hypothèse est à vérifier en dosant la concentration de granzyme B libéré par les neutrophiles incubés avec du milieu de culture de cellules tumorales sénescents ou contrôles et traités par du lipide A. Il faudra également mesurer la cytotoxicité des milieux conditionnés de ces neutrophiles sur les cellules tumorales.

D'autre part, nous avons émis l'hypothèse que lorsque les cellules immunitaires sont recrutées dans le microenvironnement tumoral modifié par les cellules sénescents, leur capacité à réagir au lipide A est augmentée. En effet, une étude publiée en 1996 a montré que les macrophages péritonéaux isolés de souris âgées présentaient une augmentation de la production de NO lorsqu'ils sont traités par du LPS par rapport aux macrophages isolés de souris jeunes (Chen et al., 1996). Nous avons donc isolé des macrophages péritonéaux de souris jeunes, nous les avons incubés pendant 24h avec les surnageants de culture de cellules tumorales contrôles ou sénescents et du lipide A puis nous avons mesuré la production de NO dans les surnageants. Nous avons observé une augmentation de la production de NO en réponse au traitement par le lipide A lorsque les macrophages sont incubés en présence de surnageant de culture de cellules tumorales sénescents (annexe 5). Ces résultats semblent valider notre hypothèse et ces travaux doivent être poursuivis afin d'étudier la réponse des neutrophiles au lipide A en présence de surnageant de culture de cellules tumorales sénescents. Si nous découvrons que cette réponse est augmentée il faudra alors déterminer le mécanisme moléculaire impliqué.

Il semble donc que l'induction de la sénescence des cellules tumorales par l'oxaliplatine augmente l'efficacité du traitement par le lipide A de nombreuses manières. En effet, l'entrée en sénescence des cellules tumorales bloque leur prolifération et induit l'expression de gènes à l'origine de modifications moléculaires et cellulaires du microenvironnement tumoral.

Ainsi, nous avons montré que la sénescence induit une inflammation chronique et le recrutement de neutrophiles au sein des tumeurs. D'autre part, il semblerait que la sénescence puisse augmenter la réponse des cellules immunitaires au traitement par le lipide A et sensibilise les cellules tumorales à la mort induite par le granzyme B. L'induction de la sénescence semble donc être une approche très intéressante dans le traitement des cancers si elle est associée à une immunothérapie.

En effet, utilisée seule, l'induction de la sénescence peut être délétère et créer plus de problème qu'elle n'en résout (Gordon & Nelson, 2012). Les molécules sécrétées par les cellules sénescents peuvent favoriser la prolifération des cellules tumorales non sénescents (Krtolica et al., 2001) et augmenter les capacités invasives des cellules tumorales en favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse (Coppé et al., 2008). Ce phénotype a été impliqué dans l'apparition de résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie et aux traitements par les radiations (McConkey et al., 2009). De plus, différents travaux ont montré que sous certaines conditions, notamment la perte de l'expression des protéines p53 et p16, les cellules pouvaient échapper à la sénescence et redevenir proliférative (Beauséjour et al., 2003; Dirac & Bernards, 2003; Sage et al., 2003). La sortie de sénescence des cellules est souvent associée à l'apparition de résistance aux chimiothérapies (Puig et al., 2008).

Néanmoins, la coloration des cellules sénescents dans les tumeurs des rats traités par la combinaison oxaliplatine / lipide A ne montre pas d'augmentation de leur quantité par rapport aux tumeurs des rats traités par le lipide A seul et contrôles. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce fait, soit le traitement par le lipide A induit l'échappement des cellules à la sénescence, soit les cellules sénescents sont éliminées.

Des expériences sont en cours pour déterminer si l'une au moins de ces hypothèses est juste. En effet, nous induisons *in vitro* l'entrée en sénescence de cellules tumorales avec de l'oxaliplatine pendant 8 jours puis nous traitons les cellules avec du lipide A pendant 24h. L'analyse par cytométrie en flux de la quantité de cellules positives pour le DDAO devrait nous permettre de déterminer si le lipide A induit un échappement à la sénescence.

Nous ignorons par quel mécanisme les cellules sénescents seraient éliminées par le traitement par le lipide A. Néanmoins en 2011 Crescenzi a montré que l'augmentation de la production de TNF α et d'IFN γ induit l'expression du récepteur de mort FAS et une diminution de la résistance à l'apoptose induite par FAS (Crescenzi et al., 2011). Nous avons

montré que l'induction de la sénescence par l'oxaliplatine induit une augmentation de la concentration de ces cytokines dans les tumeurs, il serait donc intéressant de vérifier si l'activation de l'apoptose par FAS peut expliquer la disparition des cellules tumorales sénescents.

Les travaux présentés démontrent clairement que l'activation du système immunitaire en association avec la chimiothérapie permettrait d'augmenter les chances de survie des malades et de limiter le risque de rechute grâce au développement d'une mémoire immunitaire. En effet, de nombreuses molécules utilisées en chimiothérapie induisent la sénescence d'une partie des cellules tumorales (Gewirtz et al., 2008) et nous avons montré que l'association sénescence et immunothérapie a un effet synergique dans la résolution des cancers. De plus, le GM-CSF, déjà utilisé en clinique (Kirkwood et al., 2012), pourrait être associé à l'immunothérapie pour augmenter le recrutement et la survie des neutrophiles, de même que l'IL-2, l'IL-12 et l'IFN γ permettraient d'induire la production et la libération de granzyme B par ces cellules.

L'immunothérapie des cancers par des dérivés bactériens est une approche très intéressante qui peut être très efficace notamment dans le traitement des malades présentant des tumeurs avancées. Un certain nombre de questions sont encore posées, cependant il est désormais nécessaire de développer des essais cliniques validant cette approche chez l'Homme et permettant un transfert rapide dans la pratique clinique afin d'en faire bénéficier les patients et d'améliorer leur chance de guérison.

Bibliographie

- ACOSTA, J. C. & GIL, J. (2012). Senescence: a new weapon for cancer therapy. *Trends Cell Biol* **22**, 211-9.
- ACOSTA, J. C., O'LOGHLEN, A., BANITO, A., GUIJARRO, M. V., AUGERT, A., RAGUZ, S., FUMAGALLI, M., DA COSTA, M., BROWN, C., POPOV, N., TAKATSU, Y., MELAMED, J., D'ADDA DI FAGAGNA, F., BERNARD, D., HERNANDO, E. & GIL, J. (2008a). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**, 1006-18.
- ACOSTA, J. C., O'LOGHLEN, A., BANITO, A., RAGUZ, S. & GIL, J. (2008b). Control of senescence by CXCR2 and its ligands. *Cell Cycle* **7**, 2956-9.
- ACUFF, H. B., CARTER, K. J., FINGLETON, B., GORDEN, D. L. & MATRISIAN, L. M. (2006). Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res* **66**, 259-66.
- ADAMS, P. D. (2007). Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging. *Gene* **397**, 84-93.
- ADRAIN, C., MURPHY, B. M. & MARTIN, S. J. (2005). Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J Biol Chem* **280**, 4663-73.
- AKASHI, S., NAGAI, Y., OGATA, H., OIKAWA, M., FUKASE, K., KUSUMOTO, S., KAWASAKI, K., NISHIJIMA, M., HAYASHI, S., KIMOTO, M. & MIYAKE, K. (2001). Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int Immunol* **13**, 1595-9.
- AKIRA, S., TAKEDA, K. & KAISHO, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675-80.
- ALIMONTI, A., NARDELLA, C., CHEN, Z., CLOHESSY, J. G., CARRACEDO, A., TROTMAN, L. C., CHENG, K., VARMEH, S., KOZMA, S. C., THOMAS, G., ROSIVATZ, E., WOSCHOLSKI, R., COGNETTI, F., SCHER, H. I. & PANDOLFI, P. P. (2010). A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J Clin Invest* **120**, 681-93.
- ALLAVENA, P., SICA, A., SOLINAS, G., PORTA, C. & MANTOVANI, A. (2008). The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* **66**, 1-9.
- ANDRÉ, T., LOUVET, C., MAINDRAULT-GOEBEL, F. & GRAMONT, A. D. (2001). [Oxaliplatin in combination with 5-fluoro-uracil and folinic acid as treatment of metastatic colorectal cancer]. *Bull Cancer* **88 Spec No**, S20-5.
- AYBAY, C. & IMIR, T. (1998). Comparison of the effects of Salmonella minnesota Re595 lipopolysaccharide, lipid A and monophosphoryl lipid A on nitric oxide, TNF-alpha, and IL-6 induction from RAW 264.7 macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **22**, 263-73.
- BARTKOVA, J., REZAEI, N., LIONTOS, M., KARAKAIDOS, P., KLETSAS, D., ISSAEVA, N., VASSILIOU, L. V., KOLETTAS, E., NIFOROU, K., ZOUMPOURLIS, V. C., TAKAOKA, M., NAKAGAWA, H., TORT, F., FUGGER, K., JOHANSSON, F., SEHESTED, M., ANDERSEN, C. L., DYRSKJOT, L., ØRNTØFT, T., LUKAS, J., KITTAS, C., HELLEDAY, T., HALAZONETIS, T. D., BARTEK, J. & GORGOLIS, V. G. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633-7.
- BAUER, J. A., MORRISON, B. H., GRANE, R. W., JACOBS, B. S., DABNEY, S., GAMERO, A. M., CARNEVALE, K. A., SMITH, D. J., DRAZBA, J., SEETHARAM, B. & LINDNER, D. J. (2002). Effects of interferon beta on transcobalamin II-receptor expression and antitumor activity of nitrosylcobalamin. *J Natl Cancer Inst* **94**, 1010-9.
- BEAUSÉJOUR, C. M., KRTOLICA, A., GALIMI, F., NARITA, M., LOWE, S. W., YASWEN, P. & CAMPISI, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* **22**, 4212-22.
- BEAUVILLAIN, C., DELNESTE, Y., SCOTET, M., PERES, A., GASCAN, H., GUERMONPREZ, P., BARNABA, V. & JEANNIN, P. (2007). Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood* **110**, 2965-73.
- BEN-PORATH, I. & WEINBERG, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 961-76.

- BERTHOUS, C., MAROLLEAU, J. P., LAFAURIE, C., SOULIÉ, A., DAL CORTIVO, L., BOURGE, J. F., BENBUNAN, M. & SASPORTES, M. (1995). Granzyme B and perforin lytic proteins are expressed in CD34+ peripheral blood progenitor cells mobilized by chemotherapy and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **86**, 3500-6.
- BEUTLER, B. & RIETSCHEL, E. T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* **3**, 169-76.
- BLADERGROEN, B. A., MEIJER, C. J., TEN BERGE, R. L., HACK, C. E., MURIS, J. J., DUKERS, D. F., CHOTT, A., KAZAMA, Y., OUDEJANS, J. J., VAN BERKUM, O. & KUMMER, J. A. (2002). Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood* **99**, 232-7.
- BLADERGROEN, B. A., STRIK, M. C., BOVENSCHEN, N., VAN BERKUM, O., SCHEFFER, G. L., MEIJER, C. J., HACK, C. E. & KUMMER, J. A. (2001). The granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, is mainly expressed by dendritic cells and at immune-privileged sites. *J Immunol* **166**, 3218-25.
- BLEIBERG, H. (1999). CPT-11 in gastrointestinal cancer. *Eur J Cancer* **35**, 371-9.
- BODNAR, A. G., OUELLETTE, M., FROLKIS, M., HOLT, S. E., CHIU, C. P., MORIN, G. B., HARLEY, C. B., SHAY, J. W., LICHTSTEINER, S. & WRIGHT, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-52.
- BOHLE, A. & BRANDAU, S. (2003). Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol* **170**, 964-9.
- BOIVIN, W. A., COOPER, D. M., HIEBERT, P. R. & GRANVILLE, D. J. (2009). Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. *Lab Invest* **89**, 1195-220.
- BORREGAARD, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657-70.
- BOSSI, G. & GRIFFITHS, G. M. (2005). CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Semin Immunol* **17**, 87-94.
- BOTS, M., DE BRUIN, E., RADEMAKER-KOOT, M. T. & MEDEMA, J. P. (2007). Proteinase inhibitor-9 expression is induced by maturation in dendritic cells via p38 MAP kinase. *Hum Immunol* **68**, 959-64.
- BOTS, M. & MEDEMA, J. P. (2006). Granzymes at a glance. *J Cell Sci* **119**, 5011-4.
- BRAIG, M., LEE, S., LODDENKEMPER, C., RUDOLPH, C., PETERS, A. H., SCHLEGELBERGER, B., STEIN, H., DÖRKEN, B., JENUWEIN, T. & SCHMITT, C. A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**, 660-5.
- BRETSCHER, P. & COHN, M. (1970). A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* **169**, 1042-9.
- BRINKMANN, V., LAUBE, B., ABU ABED, U., GOOSMANN, C. & ZYCHLINSKY, A. (2010). Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J Vis Exp*.
- BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., WEISS, D. S., WEINRAUCH, Y. & ZYCHLINSKY, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532-5.
- BROMLEY, S. K., BURACK, W. R., JOHNSON, K. G., SOMERSALO, K., SIMS, T. N., SUMEN, C., DAVIS, M. M., SHAW, A. S., ALLEN, P. M. & DUSTIN, M. L. (2001). The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* **19**, 375-96.
- BROSMAN, S. A. (1985). The use of bacillus Calmette-Guerin in the therapy of bladder carcinoma in situ. *J Urol* **134**, 36-9.
- BROWN, C. J., LAIN, S., VERMA, C. S., FERSHT, A. R. & LANE, D. P. (2009). Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer* **9**, 862-73.
- BRUNET, J. F., DOSSETO, M., DENIZOT, F., MATTEI, M. G., CLARK, W. R., HAQQI, T. M., FERRIER, P., NABHOLZ, M., SCHMITT-VERHULST, A. M., LUCIANI, M. F. & GOLSTEIN, P. (1986). The inducible cytotoxic T-lymphocyte-associated gene transcript CTLA-1 sequence and gene localization to mouse chromosome 14. *Nature* **322**, 268-71.
- BRUNO, A. P., LAUTIER, D., D'ORGEIX, A. T., LAURENT, G. & QUILLET-MARY, A. (2000). Acute myeloblastic leukemic cells acquire cellular cytotoxicity under genotoxic stress: implication of granzyme B and perforin. *Blood* **96**, 1914-20.

- BUZZA, M. S. & BIRD, P. I. (2006). Extracellular granzymes: current perspectives. *Biol Chem* **387**, 827-37.
- BUZZA, M. S., HIRST, C. E., BIRD, C. H., HOSKING, P., MCKENDRICK, J. & BIRD, P. I. (2001). The granzyme B inhibitor, PI-9, is present in endothelial and mesothelial cells, suggesting that it protects bystander cells during immune responses. *Cell Immunol* **210**, 21-9.
- CAINO, M. C., MESHKI, J. & KAZANIETZ, M. G. (2009). Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players. *Apoptosis* **14**, 392-408.
- CAMPISI, J. (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* **11**, S27-31.
- CAMPISI, J. & D'ADDA DI FAGAGNA, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 729-40.
- CASSIDY, J. & MISSET, J. L. (2002). Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. *Semin Oncol* **29**, 11-20.
- CATALONA, W. J., HUDSON, M. A., GILLEN, D. P., ANDRIOLE, G. L. & RATLIFF, T. L. (1987). Risks and benefits of repeated courses of intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer. *J Urol* **137**, 220-4.
- CAVALLO, F., GIOVARELLI, M., GULINO, A., VACCA, A., STOPPACCIARO, A., MODESTI, A. & FORNI, G. (1992). Role of neutrophils and CD4+ T lymphocytes in the primary and memory response to nonimmunogenic murine mammary adenocarcinoma made immunogenic by IL-2 gene. *J Immunol* **149**, 3627-35.
- CHANG, B. D., SWIFT, M. E., SHEN, M., FANG, J., BROUDE, E. V. & RONINSON, I. B. (2002). Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 389-94.
- CHAWLA-SARKAR, M., BAUER, J. A., LUPICA, J. A., MORRISON, B. H., TANG, Z., OATES, R. K., ALMASAN, A., DIDONATO, J. A., BORDEN, E. C. & LINDNER, D. J. (2003). Suppression of NF-kappa B survival signaling by nitrosylcobalamin sensitizes neoplasms to the anti-tumor effects of Apo2L/TRAIL. *J Biol Chem* **278**, 39461-9.
- CHEN, J. H., HALES, C. N. & OZANNE, S. E. (2007). DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res* **35**, 7417-28.
- CHEN, L. C., PACE, J. L., RUSSELL, S. W. & MORRISON, D. C. (1996). Altered regulation of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages from senescent mice. *Infect Immun* **64**, 4288-98.
- CHEN, Y. L., CHEN, S. H., WANG, J. Y. & YANG, B. C. (2003). Fas ligand on tumor cells mediates inactivation of neutrophils. *J Immunol* **171**, 1183-91.
- CHEN, Z., TROTMAN, L. C., SHAFFER, D., LIN, H. K., DOTAN, Z. A., NIKI, M., KOUTCHER, J. A., SCHER, H. I., LUDWIG, T., GERALD, W., CORDON-CARDO, C. & PANDOLFI, P. P. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725-30.
- CHIU, S. J., LEE, Y. J., HSU, T. S. & CHEN, W. S. (2009). Oxaliplatin-induced gamma-H2AX activation via both p53-dependent and -independent pathways but is not associated with cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *Chem Biol Interact* **182**, 173-82.
- CHOWDHURY, D. & LIEBERMAN, J. (2008). Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* **26**, 389-420.
- CHOY, J. C., McDONALD, P. C., SUAREZ, A. C., HUNG, V. H., WILSON, J. E., MCMANUS, B. M. & GRANVILLE, D. J. (2003). Granzyme B in atherosclerosis and transplant vascular disease: association with cell death and atherosclerotic disease severity. *Mod Pathol* **16**, 460-70.
- CICCIA, A. & ELLEDGE, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **40**, 179-204.
- COLLADO, M. & SERRANO, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* **10**, 51-7.
- COLOMBO, M. P., LOMBARDI, L., STOPPACCIARO, A., MELANI, C., PARENZA, M., BOTTAZZI, B. & PARMIANI, G. (1992). Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) gene transduction in murine adenocarcinoma drives neutrophil-mediated tumor inhibition in vivo. Neutrophils

- discriminate between G-CSF-producing and G-CSF-nonproducing tumor cells. *J Immunol* **149**, 113-9.
- COPPE, J. P., KAUSER, K., CAMPISI, J. & BEAUSEJOUR, C. M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* **281**, 29568-74.
- COPPE, J. P., PATIL, C. K., RODIER, F., SUN, Y., MUÑOZ, D. P., GOLDSTEIN, J., NELSON, P. S., DESPREZ, P. Y. & CAMPISI, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* **6**, 2853-68.
- COURTOIS-COX, S., GENTHER WILLIAMS, S. M., RECZEK, E. E., JOHNSON, B. W., MCGILICUDDY, L. T., JOHANNESSEN, C. M., HOLLSTEIN, P. E., MACCOLLIN, M. & CICHOWSKI, K. (2006). A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* **10**, 459-72.
- COURTOIS-COX, S., JONES, S. L. & CICHOWSKI, K. (2008). Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* **27**, 2801-9.
- CRESCENZI, E., PACIFICO, F., LAVORGNA, A., DE PALMA, R., D'AIUTO, E., PALUMBO, G., FORMISANO, S. & LEONARDI, A. (2011). NF- κ B-dependent cytokine secretion controls Fas expression on chemotherapy-induced premature senescent tumor cells. *Oncogene* **30**, 2707-17.
- CVETKOVIC, I., MILJKOVIC, D., VUCKOVIC, O., HARHAJ, L., NIKOLIC, Z., TRAJKOVIC, V. & MOSTARICA STOJKOVIC, M. (2004). Taxol activates inducible nitric oxide synthase in rat astrocytes: the role of MAP kinases and NF-kappaB. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1167-75.
- D'ADDA DI FAGAGNA, F., REAPER, P. M., CLAY-FARRACE, L., FIEGLER, H., CARR, P., VON ZGLINICKI, T., SARETZKI, G., CARTER, N. P. & JACKSON, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-8.
- DARMON, A. J., NICHOLSON, D. W. & BLEACKLEY, R. C. (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* **377**, 446-8.
- DE BONO, J. S., DALGLEISH, A. G., CARMICHAEL, J., DIFFLEY, J., LOFTS, F. J., FYFFE, D., ELLARD, S., GORDON, R. J., BRINDLEY, C. J. & EVANS, T. R. (2000). Phase I study of ONO-4007, a synthetic analogue of the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharide. *Clin Cancer Res* **6**, 397-405.
- DE LARCO, J. E., WUERTZ, B. R. & FURCHT, L. T. (2004). The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. *Clin Cancer Res* **10**, 4895-900.
- DI CARLO, E., FORNI, G., LOLLINI, P., COLOMBO, M. P., MODESTI, A. & MUSIANI, P. (2001). The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood* **97**, 339-45.
- DI CARLO, E., IEZZI, M., PANNELLINI, T., ZACCARDI, F., MODESTI, A., FORNI, G. & MUSIANI, P. (2001). Neutrophils in anti-cancer immunological strategies: old players in new games. *J Hematother Stem Cell Res* **10**, 739-48.
- DI MICCO, R., FUMAGALLI, M., CICALESE, A., PICCININ, S., GASPARINI, P., LUISE, C., SCHURRA, C., GARRE', M., NUCIFORO, P. G., BENSIMON, A., MAESTRO, R., PELICCI, P. G. & D'ADDA DI FAGAGNA, F. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638-42.
- DIMRI, G. P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E. E., LINSKENS, M., RUBELJ, I. & PEREIRA-SMITH, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-7.
- DIRAC, A. M. & BERNARDS, R. (2003). Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *J Biol Chem* **278**, 11731-4.
- DOI, K., HORIUCHI, T., UCHINAMI, M., TABO, T., KIMURA, N., YOKOMACHI, J., YOSHIDA, M. & TANAKA, K. (2002). Neutrophil elastase inhibitor reduces hepatic metastases induced by ischaemia-reperfusion in rats. *Eur J Surg* **168**, 507-10.
- DONSKOV, F. (2013). Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. *Semin Cancer Biol* **23**, 200-7.
- DUAN, J., ZHANG, Z. & TONG, T. (2005). Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1407-20.

- DUNZENDORFER, S., LEE, H. K., SOLDAU, K. & TOBIAS, P. S. (2004). Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. *FASEB J* **18**, 1117-9.
- EFEYAN, A., ORTEGA-MOLINA, A., VELASCO-MIGUEL, S., HERRANZ, D., VASSILEV, L. T. & SERRANO, M. (2007). Induction of p53-dependent senescence by the MDM2 antagonist nutlin-3a in mouse cells of fibroblast origin. *Cancer Res* **67**, 7350-7.
- ERMERT, D., URBAN, C. F., LAUBE, B., GOOSMANN, C., ZYCHLINSKY, A. & BRINKMANN, V. (2009). Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J Innate Immun* **1**, 181-93.
- ERRIDGE, C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol*.
- FAIVRE, J., DANCOURT, V., LEJEUNE, C., TAZI, M. A., LAMOUR, J., GERARD, D., DASSONVILLE, F. & BONITHON-KOPP, C. (2004). Reduction in colorectal cancer mortality by fecal occult blood screening in a French controlled study. *Gastroenterology* **126**, 1674-80.
- FEHNIGER, T. A., CAI, S. F., CAO, X., BREDEMEYER, A. J., PRESTI, R. M., FRENCH, A. R. & LEY, T. J. (2007). Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity* **26**, 798-811.
- FLAHERTY, S. F., GOLENBOCK, D. T., MILHAM, F. H. & INGALLS, R. R. (1997). CD11/CD18 leukocyte integrins: new signaling receptors for bacterial endotoxin. *J Surg Res* **73**, 85-9.
- FREUND, A., ORJALO, A. V., DESPREZ, P. Y. & CAMPISI, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* **16**, 238-46.
- FRIDLENDER, Z. G. & ALBELDA, S. M. (2012). Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* **33**, 949-55.
- FRIDLENDER, Z. G., SUN, J., KIM, S., KAPOOR, V., CHENG, G., LING, L., WORTHEN, G. S. & ALBELDA, S. M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* **16**, 183-94.
- FROELICH, C. J., ORTH, K., TURBOV, J., SETH, P., GOTTLIEB, R., BABIOR, B., SHAH, G. M., BLEACKLEY, R. C., DIXIT, V. M. & HANNA, W. (1996). New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem* **271**, 29073-9.
- FUNAYAMA, R., SAITO, M., TANOBE, H. & ISHIKAWA, F. (2006). Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol* **175**, 869-80.
- GARBAN, H. J. & BONAVIDA, B. (1999). Nitric oxide sensitizes ovarian tumor cells to Fas-induced apoptosis. *Gynecol Oncol* **73**, 257-64.
- GERRARD, T. L., COHEN, D. J. & KAPLAN, A. M. (1981). Human neutrophil-mediated cytotoxicity to tumor cells. *J Natl Cancer Inst* **66**, 483-8.
- GEWIRTZ, D. A., HOLT, S. E. & ELMORE, L. W. (2008). Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. *Biochem Pharmacol* **76**, 947-57.
- GMEINER, J., LÜDERITZ, O. & WESTPHAL, O. (1969). Biochemical studies on lipopolysaccharides of Salmonella R mutants. 6. Investigations on the structure of the lipid A component. *Eur J Biochem* **7**, 370-9.
- GODALY, G. & YOUNG, D. B. (2005). Mycobacterium bovis bacille Calmette Guerin infection of human neutrophils induces CXCL8 secretion by MyD88-dependent TLR2 and TLR4 activation. *Cell Microbiol* **7**, 591-601.
- GOMEZ-CURET, I., PERKINS, R. S., BENNETT, R., FEIDLER, K. L., DUNN, S. P. & KRUEGER, L. J. (2006). c-Myc inhibition negatively impacts lymphoma growth. *J Pediatr Surg* **41**, 207-11; discussion 207-11.
- GORDON, R. R. & NELSON, P. S. (2012). Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance. *Drug Resist Updat* **15**, 123-31.
- GOURDIER, I., CRABBE, L., ANDREAU, K., PAU, B. & KROEMER, G. (2004). Oxaliplatin-induced mitochondrial apoptotic response of colon carcinoma cells does not require nuclear DNA. *Oncogene* **23**, 7449-57.
- GRANOT, Z., HENKE, E., COMEN, E. A., KING, T. A., NORTON, L. & BENEZRA, R. (2011). Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell* **20**, 300-14.

- GREGORY, A. D. & HOUGHTON, A. M. (2011). Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res* **71**, 2411-6.
- GREWAL, A. S., CARPIO, M. & BABIUK, L. A. (1980). Polymorphonuclear neutrophil-mediated antibody-dependent cell cytotoxicity of herpesvirus-infected cells: ultrastructural studies. *Can J Microbiol* **26**, 427-35.
- GRIVENNIKOV, S. I., GRETEN, F. R. & KARIN, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-99.
- GRIVICICH, I., MANS, D. R., PETERS, G. J. & SCHWARTSMANN, G. (2001). Irinotecan and oxaliplatin: an overview of the novel chemotherapeutic options for the treatment of advanced colorectal cancer. *Braz J Med Biol Res* **34**, 1087-103.
- GROSS, C., SCHMIDT-WOLF, I. G., NAGARAJ, S., GASTPAR, R., ELLWART, J., KUNZ-SCHUGHART, L. A. & MÜLTHOFF, G. (2003). Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells. *Cell Stress Chaperones* **8**, 348-60.
- GROSSMAN, W. J. & LEY, T. J. (2004). Granzymes A and B are not expressed in human neutrophils. *Blood* **104**, 906-7; author reply 907-8.
- GROSSMAN, W. J., VERBSKY, J. W., TOLLEFSEN, B. L., KEMPER, C., ATKINSON, J. P. & LEY, T. J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* **104**, 2840-8.
- GUHA, M., BAI, W., NADLER, J. L. & NATARAJAN, R. (2000). Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* **275**, 17728-39.
- HABICH, C., BAUMGART, K., KOLB, H. & BURKART, V. (2002). The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J Immunol* **168**, 569-76.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-74.
- HARLEY, C. B., FUTCHER, A. B. & GREIDER, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-60.
- HASE, S. & RIETSCHEL, E. T. (1976). Isolation and analysis of the lipid A backbone. Lipid A structure of lipopolysaccharides from various bacterial groups. *Eur J Biochem* **63**, 101-7.
- HAYFLICK, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res* **37**, 614-36.
- HAYFLICK, L. & MOORHEAD, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621.
- HEIBEIN, J. A., GOPING, I. S., BARRY, M., PINKOSKI, M. J., SHORE, G. C., GREEN, D. R. & BLEACKLEY, R. C. (2000). Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bcl-2 and bax. *J Exp Med* **192**, 1391-402.
- HENGARTNER, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-6.
- HERBIG, U., JOBLING, W. A., CHEN, B. P., CHEN, D. J. & SEDIVY, J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* **14**, 501-13.
- HERNANDEZ-PIGEON, H., JEAN, C., CHARRUYER, A., HAURE, M. J., TITEUX, M., TONASSO, L., QUILLET-MARY, A., BAUDOUIN, C., CHARVERON, M. & LAURENT, G. (2006). Human keratinocytes acquire cellular cytotoxicity under UV-B irradiation. Implication of granzyme B and perforin. *J Biol Chem* **281**, 13525-32.
- HERR, H. W., SCHWALB, D. M., ZHANG, Z. F., SOGANI, P. C., FAIR, W. R., WHITMORE, W. F., JR. & OETTGEN, H. F. (1995). Intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy prevents tumor progression and death from superficial bladder cancer: ten-year follow-up of a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* **13**, 1404-8.
- HICKS, A. M., RIEDLINGER, G., WILLINGHAM, M. C., ALEXANDER-MILLER, M. A., VON KAP-HERR, C., PETTENATI, M. J., SANDERS, A. M., WEIR, H. M., DU, W., KIM, J., SIMPSON, A. J., OLD, L. J. & CUI, Z. (2006). Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7753-8.

- HIEBERT, P. R. & GRANVILLE, D. J. (2012). Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends Mol Med* **18**, 732-41.
- HIRST, C. E., BUZZA, M. S., BIRD, C. H., WARREN, H. S., CAMERON, P. U., ZHANG, M., ASHTON-RICKARDT, P. G. & BIRD, P. I. (2003). The intracellular granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector cell degranulation, and its overexpression enhances CTL potency. *J Immunol* **170**, 805-15.
- HIRST, C. E., BUZZA, M. S., SUTTON, V. R., TRAPANI, J. A., LOVELAND, K. L. & BIRD, P. I. (2001). Perforin-independent expression of granzyme B and proteinase inhibitor 9 in human testis and placenta suggests a role for granzyme B-mediated proteolysis in reproduction. *Mol Hum Reprod* **7**, 1133-42.
- HORIUCHI, K., SAITO, S., SASAKI, R., TOMATSU, T. & TOYAMA, Y. (2003). Expression of granzyme B in human articular chondrocytes. *J Rheumatol* **30**, 1799-810.
- HOSSEINI, A., KOSKELA, L. R., EHREN, I., AGUILAR-SANTELISES, M., SIRSO, A. & WIKLUND, N. P. (2006). Enhanced formation of nitric oxide in bladder carcinoma in situ and in BCG treated bladder cancer. *Nitric Oxide* **15**, 337-43.
- HOUGHTON, A. M., RZYMKIEWICZ, D. M., JI, H., GREGORY, A. D., EGEA, E. E., METZ, H. E., STOLZ, D. B., LAND, S. R., MARCONCINI, L. A., KLIMENT, C. R., JENKINS, K. M., BEAULIEU, K. A., MOUDED, M., FRANK, S. J., WONG, K. K. & SHAPIRO, S. D. (2010). Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med* **16**, 219-23.
- HUANG, M. J., CHENG, Y. C., LIU, C. R., LIN, S. & LIU, H. E. (2006). A small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, induces cell-cycle arrest, apoptosis, and myeloid differentiation of human acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* **34**, 1480-9.
- HUBERT, P., HEITZMANN, A., VIEL, S., NICOLAS, A., SASTRE-GARAU, X., OPPEZZO, P., PRITSCH, O., OSINAGA, E. & AMIGORENA, S. (2011). Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy. *Cancer Res* **71**, 5134-43.
- HUERTA-YEPEZ, S., VEGA, M., JAZIREHI, A., GARBAN, H., HONGO, F., CHENG, G. & BONAVIDA, B. (2004). Nitric oxide sensitizes prostate carcinoma cell lines to TRAIL-mediated apoptosis via inactivation of NF-kappa B and inhibition of Bcl-xl expression. *Oncogene* **23**, 4993-5003.
- INGALLS, R. R., HEINE, H., LIEN, E., YOSHIMURA, A. & GOLENBOCK, D. (1999a). Lipopolysaccharide recognition, CD14, and lipopolysaccharide receptors. *Infect Dis Clin North Am* **13**, 341-53, vii.
- INGALLS, R. R., MONKS, B. G. & GOLENBOCK, D. T. (1999b). Membrane expression of soluble endotoxin-binding proteins permits lipopolysaccharide signaling in Chinese hamster ovary fibroblasts independently of CD14. *J Biol Chem* **274**, 13993-8.
- ISAMBERT, N., FUMOLEAU, P., PAUL, C., FERRAND, C., ZANETTA, S., BAUER, J., RAGOT, K., LIZARD, G., JEANNIN, J. F. & BARDOU, M. (2013). Phase I study of OM-174, a lipid A analogue, with assessment of immunological response, in patients with refractory solid tumors. *BMC Cancer* **13**, 172.
- ISHIHARA, Y., FUJII, T., IJIMA, H., SAITO, K. & MATSUNAGA, K. (1998a). The role of neutrophils as cytotoxic cells in lung metastasis: suppression of tumor cell metastasis by a biological response modifier (PSK). *In Vivo* **12**, 175-82.
- ISHIHARA, Y., IJIMA, H. & MATSUNAGA, K. (1998b). Contribution of cytokines on the suppression of lung metastasis. *Biotherapy* **11**, 267-75.
- ISMAILI, J., RENNESSON, J., AKSOY, E., VEKEMANS, J., VINCART, B., AMRAOUI, Z., VAN LAETHEM, F., GOLDMAN, M. & DUBOIS, P. M. (2002). Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J Immunol* **168**, 926-32.
- JACKSON, A. M., ALEXANDROFF, A. B., KELLY, R. W., SKIBINSKA, A., ESUVARANATHAN, K., PRESCOTT, S., CHISHOLM, G. D. & JAMES, K. (1995). Changes in urinary cytokines and soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy. *Clin Exp Immunol* **99**, 369-75.
- JACKSON, S. P. & BARTEK, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071-8.
- JAEGER, B. N., DONADIEU, J., COGNET, C., BERNAT, C., ORDOÑEZ-RUEDA, D., BARLOGIS, V., MAHLAOU, N., FENIS, A., NARNI-MANCINELLI, E., BEAUPAIN, B., BELLANNE-CHANTELOT,

- C., BAJENOFF, M., MALISSEN, B., MALISSEN, M., VIVIER, E. & UGOLINI, S. (2012). Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med* **209**, 565-80.
- JANAS, M. L., GROVES, P., KIENZLE, N. & KELSO, A. (2005). IL-2 regulates perforin and granzyme gene expression in CD8⁺ T cells independently of its effects on survival and proliferation. *J Immunol* **175**, 8003-10.
- JANEWAY, C. (1989a). Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0. *Immunol Today* **10**, 283-6.
- JANEWAY, C. A. (1989b). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**, 1-13.
- JANEWAY, C. A. (1989c). The priming of helper T cells. *Semin Immunol* **1**, 13-20.
- JANTSCH, J., CHAKRAVORTTY, D., TURZA, N., PRECHTEL, A. T., BUCHHOLZ, B., GERLACH, R. G., VOLKE, M., GLASNER, J., WARNECKE, C., WIESENER, M. S., ECKARDT, K. U., STEINKASSERER, A., HENSEL, M. & WILLAM, C. (2008). Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J Immunol* **180**, 4697-705.
- JEANNIN, J. F. (2010). Introduction: historical background. *Adv Exp Med Biol* **667**, 1-3.
- JEANNIN, J. F., LEON, L., CORTIER, M., SASSI, N., PAUL, C. & BETTAIEB, A. (2008). Nitric oxide-induced resistance or sensitization to death in tumor cells. *Nitric Oxide* **19**, 158-63.
- JEANNIN, J. F., ONIER, N., LAGADEC, P., VON JENEY, N., STUTZ, P. & LIEHL, E. (1991). Antitumor effect of synthetic derivatives of lipid A in an experimental model of colon cancer in the rat. *Gastroenterology* **101**, 726-33.
- JENKINS, M. K., PARDOLL, D. M., MIZUGUCHI, J., QUILL, H. & SCHWARTZ, R. H. (1987). T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. *Immunol Rev* **95**, 113-35.
- KAECH, S. M., HEMBY, S., KERSH, E. & AHMED, R. (2002). Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* **111**, 837-51.
- KAMIJO, R., HARADA, H., MATSUYAMA, T., BOSLAND, M., GERECITANO, J., SHAPIRO, D., LE, J., KOH, S. I., KIMURA, T., GREEN, S. J. & ET AL. (1994). Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* **263**, 1612-5.
- KANAMORI, H., KRIEG, S., MAO, C., DI PIPPO, V. A., WANG, S., ZAJCHOWSKI, D. A. & SHAPIRO, D. J. (2000). Proteinase inhibitor 9, an inhibitor of granzyme B-mediated apoptosis, is a primary estrogen-inducible gene in human liver cells. *J Biol Chem* **275**, 5867-73.
- KANG, T. W., YEVS, T., WOLLER, N., HOENICKE, L., WUESTEFELD, T., DAUCH, D., HOHMEYER, A., GEREKE, M., RUDALSKA, R., POTAPOVA, A., IKEN, M., VUCUR, M., WEISS, S., HEIKENWALDER, M., KHAN, S., GIL, J., BRUDER, D., MANNS, M., SCHIRMACHER, P., TACKE, F., OTT, M., LUEDDE, T., LONGERICH, T., KUBICKA, S. & ZENDER, L. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**, 547-51.
- KAPLAN, M. J. & RADIC, M. (2012). Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* **189**, 2689-95.
- KATANO, M. & TORISU, M. (1982). Neutrophil-mediated tumor cell destruction in cancer ascites. *Cancer* **50**, 62-8.
- KAWAI, T., TAKEUCHI, O., FUJITA, T., INOUE, J., MUHLRADT, P. F., SATO, S., HOSHINO, K. & AKIRA, S. (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* **167**, 5887-94.
- KAWASAKI, K., AKASHI, S., SHIMAZU, R., YOSHIDA, T., MIYAKE, K. & NISHIJIMA, M. (2000). Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem* **275**, 2251-4.
- KEEFE, D., SHI, L., FESKE, S., MASSOL, R., NAVARRO, F., KIRCHHAUSEN, T. & LIEBERMAN, J. (2005). Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* **23**, 249-62.

- KELLY, M. G., ALVERO, A. B., CHEN, R., SILASI, D. A., ABRAHAMS, V. M., CHAN, S., VISINTIN, I., RUTHERFORD, T. & MOR, G. (2006). TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* **66**, 3859-68.
- KIANI, A., TSCHIRSCH, A., GABORIAU, E., OTTO, F., SEIZ, A., KNOPF, H. P., STÜTZ, P., FÄRBER, L., HAUS, U., GALANOS, C., MERTELSMANN, R. & ENGELHARDT, R. (1997). Downregulation of the proinflammatory cytokine response to endotoxin by pretreatment with the nontoxic lipid A analog SDZ MRL 953 in cancer patients. *Blood* **90**, 1673-83.
- KIRKWOOD, J. M., BUTTERFIELD, L. H., TARHINI, A. A., ZAROOR, H., KALINSKI, P. & FERRONE, S. (2012). Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin* **62**, 309-35.
- KLEINERT, H., PAUTZ, A., LINKER, K. & SCHWARZ, P. M. (2004). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* **500**, 255-66.
- KOBAYASHI, S. D., BRAUGHTON, K. R., WHITNEY, A. R., VOYICH, J. M., SCHWAN, T. G., MUSSER, J. M. & DELEO, F. R. (2003a). Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10948-53.
- KOBAYASHI, S. D., VOYICH, J. M. & DELEO, F. R. (2003b). Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect* **5**, 1337-44.
- KOBAYASHI, Y. (2008). The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* **13**, 2400-7.
- KOLACZKOWSKA, E. & KUBES, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**, 159-75.
- KORTLEVER, R. M. & BERNARDS, R. (2006). Senescence, wound healing and cancer: the PAI-1 connection. *Cell Cycle* **5**, 2697-703.
- KORTLEVER, R. M., HIGGINS, P. J. & BERNARDS, R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* **8**, 877-84.
- KOUSIS, P. C., HENDERSON, B. W., MAIER, P. G. & GOLLNICK, S. O. (2007). Photodynamic therapy enhancement of antitumor immunity is regulated by neutrophils. *Cancer Res* **67**, 10501-10.
- KRAUSE, K. H. & MICHALAK, M. (1997). Calreticulin. *Cell* **88**, 439-43.
- KRIZHANOVSKY, V., YON, M., DICKINS, R. A., HEARN, S., SIMON, J., MIETHING, C., YEE, H., ZENDER, L. & LOWE, S. W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **134**, 657-67.
- KRONBORG, O., FENGER, C., OLSEN, J., JØRGENSEN, O. D. & SØNDERGAARD, O. (1996). Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* **348**, 1467-71.
- KRTOLICA, A., PARRINELLO, S., LOCKETT, S., DESPREZ, P. Y. & CAMPISI, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12072-7.
- KUANG, D. M., ZHAO, Q., WU, Y., PENG, C., WANG, J., XU, Z., YIN, X. Y. & ZHENG, L. (2011). Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **54**, 948-55.
- KUILMAN, T., MICHALOGLU, C., MOOI, W. J. & PEEPER, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev* **24**, 2463-79.
- KUILMAN, T., MICHALOGLU, C., VREDEVELD, L. C., DOUMA, S., VAN DOORN, R., DESMET, C. J., AARDEN, L. A., MOOI, W. J. & PEEPER, D. S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**, 1019-31.
- KUILMAN, T. & PEEPER, D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer* **9**, 81-94.
- KUMAMOTO, K., SPILLARE, E. A., FUJITA, K., HORIKAWA, I., YAMASHITA, T., APPELLA, E., NAGASHIMA, M., TAKENOSHITA, S., YOKOTA, J. & HARRIS, C. C. (2008). Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. *Cancer Res* **68**, 3193-203.
- KUMAR, V. & SHARMA, A. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol* **10**, 1325-34.
- LAGADEC, P., RAYNAL, S., LIEUBEAU, B., ONIER, N., ARNOULD, L., SAINT-GIORGIO, V., LAWRENCE, D. A. & JEANNIN, J. F. (1999). Evidence for control of nitric oxide synthesis by intracellular

- transforming growth factor-beta1 in tumor cells. Implications for tumor development. *Am J Pathol* **154**, 1867-76.
- LARMONIER, C. B., ARNOULD, L., LARMONIER, N., BAUMANN, S., MOUTET, M., SAINT-GIORGIO, V., PANCE, A. & JEANNIN, J. F. (2004). Kinetics of tumor cell apoptosis and immune cell activation during the regression of tumors induced by lipid A in a rat model of colon cancer. *Int J Mol Med* **13**, 355-61.
- LAZZARINI, R., MORETTI, S., ORECCHIA, S., BETTA, P. G., PROCOPIO, A. & CATALANO, A. (2008). Enhanced antitumor therapy by inhibition of p21waf1 in human malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res* **14**, 5099-107.
- LECHNER, M. G., LIEBERTZ, D. J. & EPSTEIN, A. L. (2010). Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* **185**, 2273-84.
- LEDERBERG, J. (2002). Instructive selection and immunological theory. *Immunol Rev* **185**, 50-3.
- LEE, Y. J., LEE, K. H., KIM, H. R., JESSUP, J. M., SEOL, D. W., KIM, T. H., BILLIAR, T. R. & SONG, Y. K. (2001). Sodium nitroprusside enhances TRAIL-induced apoptosis via a mitochondria-dependent pathway in human colorectal carcinoma CX-1 cells. *Oncogene* **20**, 1476-85.
- LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-83.
- LEONARD, W. J. & SPOLSKI, R. (2005). Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* **5**, 688-98.
- LESTERHUIS, W. J., HAANEN, J. B. & PUNT, C. J. (2011). Cancer immunotherapy--revisited. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 591-600.
- LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M. I. & NOURSHARGH, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**, 678-89.
- LIBERMANN, T. A. & BALTIMORE, D. (1990). Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* **10**, 2327-34.
- LIN, H. K., CHEN, Z., WANG, G., NARDELLA, C., LEE, S. W., CHAN, C. H., YANG, W. L., WANG, J., EGIA, A., NAKAYAMA, K. I., CORDON-CARDO, C., TERUYA-FELDSTEIN, J. & PANDOLFI, P. P. (2010). Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature* **464**, 374-9.
- LINNEBACHER, M., MALETZKI, C., Klier, U. & KLAR, E. (2012). Bacterial immunotherapy of gastrointestinal tumors. *Langenbecks Arch Surg* **397**, 557-68.
- LIU, C. C., RAFII, S., GRANELLI-PIPERNO, A., TRAPANI, J. A. & YOUNG, J. D. (1989). Perforin and serine esterase gene expression in stimulated human T cells. Kinetics, mitogen requirements, and effects of cyclosporin A. *J Exp Med* **170**, 2105-18.
- LIU, D. & HORNSBY, P. J. (2007). Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res* **67**, 3117-26.
- LOBE, C. G., FINLAY, B. B., PARANCHYCH, W., PAETKAU, V. H. & BLEACKLEY, R. C. (1986a). Novel serine proteases encoded by two cytotoxic T lymphocyte-specific genes. *Science* **232**, 858-61.
- LOBE, C. G., HAVELE, C. & BLEACKLEY, R. C. (1986b). Cloning of two genes that are specifically expressed in activated cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1448-52.
- LUJAMBIO, A., AKKARI, L., SIMON, J., GRACE, D., TSCHAHARGANEH, D. F., BOLDEN, J. E., ZHAO, Z., THAPAR, V., JOYCE, J. A., KRIZHANOVSKY, V. & LOWE, S. W. (2013). Non-Cell-Autonomous Tumor Suppression by p53. *Cell* **153**, 449-60.
- LÓPEZ-LAGO, M. A., POSNER, S., THODIMA, V. J., MOLINA, A. M., MOTZER, R. J. & CHAGANTI, R. S. (2013). Neutrophil chemokines secreted by tumor cells mount a lung antimetastatic response during renal cell carcinoma progression. *Oncogene* **32**, 1752-60.
- LÓPEZ-URRUTIA, L., ALONSO, A., NIETO, M. L., BAYÓN, Y., ORDUÑA, A. & SÁNCHEZ CRESPO, M. (2000). Lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* induce nitric oxide synthesis in rat peritoneal macrophages. *Infect Immun* **68**, 1740-5.
- MANICASSAMY, S. & PULENDRAN, B. (2009). Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin Immunol* **21**, 185-93.

- MANTOVANI, A., CASSATELLA, M. A., COSTANTINI, C. & JAILLON, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **11**, 519-31.
- MARTIN, P., WALLICH, R., PARDO, J., MÜLLBACHER, A., MUNDER, M., MODOLELL, M. & SIMON, M. M. (2005). Quiescent and activated mouse granulocytes do not express granzyme A and B or perforin: similarities or differences with human polymorphonuclear leukocytes? *Blood* **106**, 2871-8.
- MASSON, D. & TSCHOPP, J. (1987). A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell* **49**, 679-85.
- MATZINGER, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* **12**, 991-1045.
- MAURI, D., KAMPOSORAS, K., TSALI, L., BRISTIANOU, M., VALACHIS, A., KARATHANASI, I., GEORGIOU, C. & POLYZOS, N. P. (2009). Overall survival benefit for weekly vs. three-weekly taxanes regimens in advanced breast cancer: A meta-analysis. *Cancer Treat Rev*.
- MCCARTHY, E. F. (2006). The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* **26**, 154-8.
- MCCONKEY, D. J., CHOI, W., MARQUIS, L., MARTIN, F., WILLIAMS, M. B., SHAH, J., SVATEK, R., DAS, A., ADAM, L., KAMAT, A., SIEFKER-RADTKE, A. & DINNEY, C. (2009). Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 335-44.
- MCGARY, C. T., MIELE, M. E. & WELCH, D. R. (1995). Highly metastatic 13762NF rat mammary adenocarcinoma cell clones stimulate bone marrow by secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3 activity. *Am J Pathol* **147**, 1668-81.
- MEDEMA, J. P., SCHUURHUIS, D. H., REA, D., VAN TONGEREN, J., DE JONG, J., BRES, S. A., LABAN, S., TOES, R. E., TOEBES, M., SCHUMACHER, T. N., BLADERGROEN, B. A., OSSENDORP, F., KUMMER, J. A., MELIEF, C. J. & OFFRINGA, R. (2001). Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis: differential modulation by T helper type 1 and type 2 cells. *J Exp Med* **194**, 657-67.
- MEDZHITOV, R. (2009). Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* **30**, 766-75.
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P. & JANEWAY, C. A. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-7.
- MEHMUT, M., TAKEDA, K., ABE, M., OGATA, H., HIROSE, S., OKUMURA, K. & FUJIME, M. (2005). Fas ligand and TNF-related apoptosis-inducing ligand induction on infiltrating lymphocytes in bladder carcinoma by bacillus Calmette-Guerin treatment. *Urol Int* **75**, 80-7.
- METKAR, S. S. & FROELICH, C. J. (2004). Human neutrophils lack granzyme A, granzyme B, and perforin. *Blood* **104**, 905-6; author reply 907-8.
- MICHALOGLOU, C., VREDEVELD, L. C., SOENGAS, M. S., DENOYELLE, C., KUILMAN, T., VAN DER HORST, C. M., MAJOOR, D. M., SHAY, J. W., MOOI, W. J. & PEEPER, D. S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720-4.
- MILLET, A., BETTAIEB, A., RENAUD, F., PREVOTAT, L., HAMMANN, A., SOLARY, E., MIGNOTTE, B. & JEANNIN, J. F. (2002). Influence of the nitric oxide donor glyceryl trinitrate on apoptotic pathways in human colon cancer cells. *Gastroenterology* **123**, 235-46.
- MIRZAYANS, R., SCOTT, A., CAMERON, M. & MURRAY, D. (2005). Induction of accelerated senescence by gamma radiation in human solid tumor-derived cell lines expressing wild-type TP53. *Radiat Res* **163**, 53-62.
- MITROPOULOS, D., PETSI, D., KYROUDI-VOULGARI, A., KOULOUKOUSSA, M., ZERVAS, A. & DIMOPOULOS, C. (2005). The effect of intravesical Bacillus Calmette-Guerin instillations on the expression of inducible nitric oxide synthase in humans. *Nitric Oxide* **13**, 36-41.
- MOORE, K. J., ANDERSSON, L. P., INGALLS, R. R., MONKS, B. G., LI, R., ARNAOUT, M. A., GOLENBOCK, D. T. & FREEMAN, M. W. (2000). Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. *J Immunol* **165**, 4272-80.
- MOTYKA, B., KORBUTT, G., PINKOSKI, M. J., HEIBEIN, J. A., CAPUTO, A., HOBMAN, M., BARRY, M., SHOSTAK, I., SAWCHUK, T., HOLMES, C. F., GAULDIE, J. & BLEACKLEY, R. C. (2000). Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* **103**, 491-500.

- MÜLLER, I., MUNDER, M., KROPP, P. & HÄNSCH, G. M. (2009). Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol* **30**, 522-30.
- NAMEKAWA, T., WAGNER, U. G., GORONZY, J. J. & WEYAND, C. M. (1998). Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* **41**, 2108-16.
- NARITA, M., KRIZHANOVSKY, V., NUÑEZ, S., CHICAS, A., HEARN, S. A., MYERS, M. P. & LOWE, S. W. (2006). A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* **126**, 503-14.
- NARITA, M., NUÑEZ, S., HEARD, E., LIN, A. W., HEARN, S. A., SPECTOR, D. L., HANNON, G. J. & LOWE, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703-16.
- NATHAN, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **6**, 173-82.
- NISHI, K., ODA, T., TAKABUCHI, S., ODA, S., FUKUDA, K., ADACHI, T., SEMENZA, G. L., SHINGU, K. & HIROTA, K. (2008). LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxid Redox Signal* **10**, 983-95.
- NOZAWA, H., CHIU, C. & HANAHAN, D. (2006). Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12493-8.
- NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1996). Gradients that organize embryo development. *Sci Am* **275**, 54-5; 58-61.
- O'NEILL, L. A. & BOWIE, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **7**, 353-64.
- O'NEILL, L. A., BRYANT, C. E. & DOYLE, S. L. (2009). Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev* **61**, 177-97.
- OBEID, M., TESNIERE, A., GHIRINGHELLI, F., FIMIA, G. M., APETOH, L., PERFETTINI, J. L., CASTEDO, M., MIGNOT, G., PANARETAKIS, T., CASARES, N., MÉTIVIER, D., LAROCLETTE, N., VAN ENDERT, P., CICCOSANTI, F., PIACENTINI, M., ZITVOGEL, L. & KROEMER, G. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* **13**, 54-61.
- OHASHI, K., BURKART, V., FLOHÉ, S. & KOLB, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* **164**, 558-61.
- ONIER, N., HILPERT, S., ARNOULD, L., SAINT-GIORGIO, V., DAVIES, J. G. & JEANNIN, J. F. (1999a). Cure of colon cancer metastasis in rats with the new lipid A OM 174. Apoptosis of tumor cells and immunization of rats. *Clin Exp Metastasis* **17**, 299-306.
- ONIER, N., HILPERT, S., REVEINEAU, S., ARNOULD, L., SAINT-GIORGIO, V., EXBRAYAT, J. M. & JEANNIN, J. F. (1999b). Expression of inducible nitric oxide synthase in tumors in relation with their regression induced by lipid A in rats. *Int J Cancer* **81**, 755-60.
- PANARETAKIS, T., KEPP, O., BROCKMEIER, U., TESNIERE, A., BJORKLUND, A. C., CHAPMAN, D. C., DURCHSCHLAG, M., JOZA, N., PIERRON, G., VAN ENDERT, P., YUAN, J., ZITVOGEL, L., MADEO, F., WILLIAMS, D. B. & KROEMER, G. (2009). Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* **28**, 578-90.
- PARKER, L. C., WHYTE, M. K., DOWER, S. K. & SABROE, I. (2005). The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol* **77**, 886-92.
- PARRINELLO, S., COPPE, J. P., KRTOLICA, A. & CAMPISI, J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci* **118**, 485-96.
- PASSOS, J. F., SARETZKI, G., AHMED, S., NELSON, G., RICHTER, T., PETERS, H., WAPPLER, I., BIRKET, M. J., HAROLD, G., SCHAEUBLE, K., BIRCH-MACHIN, M. A., KIRKWOOD, T. B. & VON ZGLINICKI, T. (2007). Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol* **5**, e110.
- PETRI, B., PHILLIPSON, M. & KUBES, P. (2008). The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol* **180**, 6439-46.
- PIAO, W., SONG, C., CHEN, H., DIAZ, M. A., WAHL, L. M., FITZGERALD, K. A., LI, L. & MEDVEDEV, A. E. (2009). Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-containing

- adapter inducing IFN-beta-dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling. *J Leukoc Biol* **86**, 863-75.
- PICCARD, H., MUSCHEL, R. J. & OPDENAKKER, G. (2012). On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit Rev Oncol Hematol* **82**, 296-309.
- PINKOSKI, M. J., HOBMAN, M., HEIBEIN, J. A., TOMASELLI, K., LI, F., SETH, P., FROELICH, C. J. & BLEACKLEY, R. C. (1998). Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood* **92**, 1044-54.
- PINKOSKI, M. J., WATERHOUSE, N. J., HEIBEIN, J. A., WOLF, B. B., KUWANA, T., GOLDSTEIN, J. C., NEWMAYER, D. D., BLEACKLEY, R. C. & GREEN, D. R. (2001). Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem* **276**, 12060-7.
- PUIG, P. E., GUILLY, M. N., BOUCHOT, A., DROIN, N., CATHELIN, D., BOUYER, F., FAVIER, L., GHIRINGHELLI, F., KROEMER, G., SOLARY, E., MARTIN, F. & CHAUFFERT, B. (2008). Tumor cells can escape DNA-damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy. *Cell Biol Int* **32**, 1031-43.
- PUSZTAI, L., MENDOZA, T. R., REUBEN, J. M., MARTINEZ, M. M., WILLEY, J. S., LARA, J., SYED, A., FRITSCH, H. A., BRUERA, E., BOOSER, D., VALERO, V., ARUN, B., IBRAHIM, N., RIVERA, E., ROYCE, M., CLEELAND, C. S. & HORTOBAGYI, G. N. (2004). Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy. *Cytokine* **25**, 94-102.
- QUEEN, M. M., RYAN, R. E., HOLZER, R. G., KELLER-PECK, C. R. & JORCYK, C. L. (2005). Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res* **65**, 8896-904.
- QUESNIAUX, V. J., NICOLLE, D. M., TORRES, D., KREMER, L., GUERARDEL, Y., NIGOU, J., PUZO, G., ERARD, F. & RYFFEL, B. (2004). Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol* **172**, 4425-34.
- RASOOL, O., NNALUE, N. A. & JARSTRAND, C. (1992). The role of O-antigen polysaccharide in the activation of neutrophils by lipopolysaccharides of Salmonella species. *Clin Exp Immunol* **90**, 63-7.
- RAYMOND, E., FAIVRE, S., COUDRAY, A. M., LOUVET, C. & GESPACH, C. (2001). [Preclinical studies of oxaliplatin in combination chemotherapy]. *Bull Cancer* **88 Spec No**, S26-34.
- RILEY, T., SONTAG, E., CHEN, P. & LEVINE, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 402-12.
- RISSOAN, M. C., DUHEN, T., BRIDON, J. M., BENDRISS-VERMARE, N., PERONNE, C., DE SAINT VIS, B., BRIERE, F. & BATES, E. E. (2002). Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **100**, 3295-303.
- ROBERSON, R. S., KUSSICK, S. J., VALLIERES, E., CHEN, S. Y. & WU, D. Y. (2005). Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res* **65**, 2795-803.
- RODIER, F., COPPÉ, J. P., PATIL, C. K., HOEIJMAKERS, W. A., MUÑOZ, D. P., RAZA, S. R., FREUND, A., CAMPEAU, E., DAVALOS, A. R. & CAMPISI, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* **11**, 973-9.
- RODRIGUEZ, N., LANG, R., WANTIA, N., CIRL, C., ERTL, T., DURR, S., WAGNER, H. & MIETHKE, T. (2008). Induction of iNOS by Chlamydia pneumoniae requires MyD88-dependent activation of JNK. *J Leukoc Biol* **84**, 1585-93.
- ROMERO, V. & ANDRADE, F. (2008). Non-apoptotic functions of granzymes. *Tissue Antigens* **71**, 409-16.
- ROSEVEAR, H. M., LIGHTFOOT, A. J., O'DONNELL, M. A. & GRIFFITH, T. S. (2009). The role of neutrophils and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 345-53.

- ROTONDO, R., BARISONE, G., MASTRACCI, L., GROSSI, F., ORENGO, A. M., COSTA, R., TRUINI, M., FABBI, M., FERRINI, S. & BARBIERI, O. (2009). IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* **125**, 887-93.
- SABROE, I., DOWER, S. K. & WHYTE, M. K. (2005a). The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis* **41 Suppl 7**, S421-6.
- SABROE, I., JONES, E. C., WHYTE, M. K. & DOWER, S. K. (2005b). Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Immunology* **115**, 90-8.
- SAGE, J., MILLER, A. L., PÉREZ-MANCERA, P. A., WYSOCKI, J. M. & JACKS, T. (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* **424**, 223-8.
- SAGIV, A., BIRAN, A., YON, M., SIMON, J., LOWE, S. W. & KRIZHANOVSKY, V. (2013). Granule exocytosis mediates immune surveillance of senescent cells. *Oncogene* **32**, 1971-7.
- SAHA, D. C., ASTIZ, M. E., LIN, R. Y., RACKOW, E. C. & EALES, L. J. (1997). Monophosphoryl lipid A stimulated up-regulation of nitric oxide synthase and nitric oxide release by human monocytes in vitro. *Immunopharmacology* **37**, 175-84.
- SAKURAI, M., EGASHIRA, N., KAWASHIRI, T., YANO, T., IKESUE, H. & OISHI, R. (2009). Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *Pain* **147**, 165-74.
- SANDER, B., DAMM, O., GUSTAFSSON, B., ANDERSSON, U. & HAKANSSON, L. (1996). Localization of IL-1, IL-2, IL-4, IL-8 and TNF in superficial bladder tumors treated with intravesical bacillus Calmette-Guerin. *J Urol* **156**, 536-41.
- SANTOS, C. X., TANAKA, L. Y., WOSNIAK, J. & LAURINDO, F. R. (2009). Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* **11**, 2409-27.
- SATO, T., TAKAHASHI, S., MIZUMOTO, T., HARAO, M., AKIZUKI, M., TAKASUGI, M., FUKUTOMI, T. & YAMASHITA, J. (2006). Neutrophil elastase and cancer. *Surg Oncol* **15**, 217-22.
- SAYERS, T. J., WILTROUT, T. A., SOWDER, R., MUNGER, W. L., SMYTH, M. J. & HENDERSON, L. E. (1992). Purification of a factor from the granules of a rat natural killer cell line (RNK) that reduces tumor cell growth and changes tumor morphology. Molecular identity with a granule serine protease (RNKP-1). *J Immunol* **148**, 292-300.
- SCAPINI, P., LAPINET-VERA, J. A., GASPERINI, S., CALZETTI, F., BAZZONI, F. & CASSATELLA, M. A. (2000). The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* **177**, 195-203.
- SCHRÖDER, M. & KAUFMAN, R. J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* **74**, 739-89.
- SCHUMANN, R. R., LEONG, S. R., FLAGGS, G. W., GRAY, P. W., WRIGHT, S. D., MATHISON, J. C., TOBIAS, P. S. & ULEVITCH, R. J. (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**, 1429-31.
- SECCHIERO, P., GONELLI, A., CELEGHINI, C., MIRANDOLA, P., GUIDOTTI, L., VISANI, G., CAPITANI, S. & ZAULI, G. (2001). Activation of the nitric oxide synthase pathway represents a key component of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated cytotoxicity on hematologic malignancies. *Blood* **98**, 2220-8.
- SEGAL, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* **23**, 197-223.
- SENDEROWICZ, A. M. (2003a). Novel direct and indirect cyclin-dependent kinase modulators for the prevention and treatment of human neoplasms. *Cancer Chemother Pharmacol* **52 Suppl 1**, S61-73.
- SENDEROWICZ, A. M. (2003b). Novel small molecule cyclin-dependent kinases modulators in human clinical trials. *Cancer Biol Ther* **2**, S84-95.
- SEOW, S. W., RAHMAT, J. N., BAY, B. H., LEE, Y. K. & MAHENDRAN, R. (2008). Expression of chemokine/cytokine genes and immune cell recruitment following the instillation of *Mycobacterium bovis*, bacillus Calmette-Guerin or *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in the healthy murine bladder. *Immunology* **124**, 419-27.

- SERRANO, M., LIN, A. W., MCCURRACH, M. E., BEACH, D. & LOWE, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593-602.
- SHEAR, M. J. & TURNER, F. C. (1943). Chemical treatment of tumors : isolation of hemorrhagic-producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrate. In *J Natl Cancer Inst*, vol. 4, pp. 81-87.
- SHI, L., MAI, S., ISRAELS, S., BROWNE, K., TRAPANI, J. A. & GREENBERG, A. H. (1997). Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J Exp Med* **185**, 855-66.
- SIMONS, M. P., MOORE, J. M., KEMP, T. J. & GRIFFITH, T. S. (2007). Identification of the mycobacterial subcomponents involved in the release of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand from human neutrophils. *Infect Immun* **75**, 1265-71.
- SINGH, T. R., SHANKAR, S., CHEN, X., ASIM, M. & SRIVASTAVA, R. K. (2003). Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma in vivo. *Cancer Res* **63**, 5390-400.
- SOEHNLEIN, O., WEBER, C. & LINDBOM, L. (2009). Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol* **30**, 538-46.
- SOUTO, J. C., VILA, L. & BRÚ, A. (2011). Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. *Med Res Rev* **31**, 311-63.
- SOWER, L. E., KLIMPEL, G. R., HANNA, W. & FROELICH, C. J. (1996). Extracellular Activities of Human Granzymes. *Cell Immunol* **171**, 159-63.
- SPARMANN, A. & BAR-SAGI, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* **6**, 447-58.
- SRIVASTAVA, R. K., SASAKI, C. Y., HARDWICK, J. M. & LONGO, D. L. (1999). Bcl-2-mediated drug resistance: inhibition of apoptosis by blocking nuclear factor of activated T lymphocytes (NFAT)-induced Fas ligand transcription. *J Exp Med* **190**, 253-65.
- STEINMAN, R. M. & WITMER, M. D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 5132-6.
- STOPPACCIARO, A., MELANI, C., PARENZA, M., MASTRACCHIO, A., BASSI, C., BARONI, C., PARMIANI, G. & COLOMBO, M. P. (1993). Regression of an established tumor genetically modified to release granulocyte colony-stimulating factor requires granulocyte-T cell cooperation and T cell-produced interferon gamma. *J Exp Med* **178**, 151-61.
- STRIK, M. C., DE KONING, P. J., KLEIJMEER, M. J., BLADERGROEN, B. A., WOLBINK, A. M., GRIFFITH, J. M., WOUTERS, D., FUKUOKA, Y., SCHWARTZ, L. B., HACK, C. E., VAN HAM, S. M. & KUMMER, J. A. (2007). Human mast cells produce and release the cytotoxic lymphocyte associated protease granzyme B upon activation. *Mol Immunol* **44**, 3462-72.
- SU, L., SUN, Y., MA, F., LU, P., HUANG, H. & ZHOU, J. (2009). Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF-kappaB activation and enhancing SOCS1 expression. *Immunol Lett* **125**, 151-5.
- SUMMERS, C., RANKIN, S. M., CONDLIFFE, A. M., SINGH, N., PETERS, A. M. & CHILVERS, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* **31**, 318-24.
- SUN, J., BIRD, C. H., SUTTON, V., McDONALD, L., COUGHLIN, P. B., DE JONG, T. A., TRAPANI, J. A. & BIRD, P. I. (1996). A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *J Biol Chem* **271**, 27802-9.
- SUN, J., OOMS, L., BIRD, C. H., SUTTON, V. R., TRAPANI, J. A. & BIRD, P. I. (1997). A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the granzyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9). *J Biol Chem* **272**, 15434-41.
- SUN, Z. & YANG, P. (2004). Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol* **5**, 182-90.
- SUTTMANN, H., RIEMENSBERGER, J., BENTEN, G., SCHMALTZ, D., STÖCKLE, M., JOCHAM, D., BÖHLE, A. & BRANDAU, S. (2006). Neutrophil granulocytes are required for effective *Bacillus Calmette-Guérin* immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. *Cancer Res* **66**, 8250-7.

- TAKAI, H., SMOGORZEWSKA, A. & DE LANGE, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* **13**, 1549-56.
- TAKAI, N., KATAOKA, M., HIGUCHI, Y., MATSUURA, K. & YAMAMOTO, S. (1997). Primary structure of rat CD14 and characteristics of rat CD14, cytokine, and NO synthase mRNA expression in mononuclear phagocyte system cells in response to LPS. *J Leukoc Biol* **61**, 736-44.
- TAKEDA, K. (2005). Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* **11**, 51-5.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**, 1-14.
- TAKEDA, K., KAISHO, T. & AKIRA, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 335-76.
- TALANIAN, R. V., YANG, X., TURBOV, J., SETH, P., GHAYUR, T., CASIANO, C. A., ORTH, K. & FROELICH, C. J. (1997). Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. *J Exp Med* **186**, 1323-31.
- TANAMOTO, K., AZUMI, S., HAISHIMA, Y., KUMADA, H. & UMEMOTO, T. (1997). Endotoxic properties of free lipid A from *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology* **143** (Pt 1), 63-71.
- TAYLOR, K. R., TROWBRIDGE, J. M., RUDISILL, J. A., TERMEER, C. C., SIMON, J. C. & GALLO, R. L. (2004). Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem* **279**, 17079-84.
- TAZZYMAN, S., LEWIS, C. E. & MURDOCH, C. (2009). Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int J Exp Pathol* **90**, 222-31.
- TE POELE, R. H., OKOROKOV, A. L., JARDINE, L., CUMMINGS, J. & JOEL, S. P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **62**, 1876-83.
- THEILGAARD-MÖNCH, K., PORSE, B. T. & BORREGAARD, N. (2006). Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr Opin Immunol* **18**, 54-60.
- THIERY, J. P., ACLOQUE, H., HUANG, R. Y. & NIETO, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871-90.
- TOBIAS, P. S., SOLDAU, K. & ULEVITCH, R. J. (1989). Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J Biol Chem* **264**, 10867-71.
- TREMAIN, R., MARKO, M., KINNIMULKI, V., UENO, H., BOTTINGER, E. & GLICK, A. (2000). Defects in TGF-beta signaling overcome senescence of mouse keratinocytes expressing v-Ha-ras. *Oncogene* **19**, 1698-709.
- TSAVARIS, N., KOSMAS, C., VADIAKA, M., KANELOPOULOS, P. & BOULAMATIS, D. (2002). Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *Br J Cancer* **87**, 21-7.
- TSCHOPP, C. M., SPIEGL, N., DIDICHENKO, S., LUTMANN, W., JULIUS, P., VIRCHOW, J. C., HACK, C. E. & DAHINDEN, C. A. (2006). Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma. *Blood* **108**, 2290-9.
- TUFI, R., PANARETAKIS, T., BIANCHI, K., CRIOLLO, A., FAZI, B., DI SANO, F., TESNIERE, A., KEPP, O., PATERLINI-BRECHOT, P., ZITVOGEL, L., PIACENTINI, M., SZABADKAI, G. & KROEMER, G. (2008). Reduction of endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels favors plasma membrane surface exposure of calreticulin. *Cell Death Differ* **15**, 274-82.
- VAN GISBERGEN, K. P., GEIJTENBEEK, T. B. & VAN KOOYK, Y. (2005). Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol* **26**, 626-31.
- VERNOOY, J. H., MÖLLER, G. M., VAN SUYLEN, R. J., VAN SPIJK, M. P., CLOOTS, R. H., HOET, P. H., PENNING, H. J. & WOUTERS, E. F. (2007). Increased granzyme A expression in type II pneumocytes of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **175**, 464-72.
- VEUGELERS, K., MOTYKA, B., GOPING, I. S., SHOSTAK, I., SAWCHUK, T. & BLEACKLEY, R. C. (2006). Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate. *Mol Biol Cell* **17**, 623-33.
- VOSIKA, G. J., BARR, C. & GILBERTSON, D. (1984). Phase-I study of intravenous modified lipid A. *Cancer Immunol Immunother* **18**, 107-12.
- WAGNER, C., IKING-KONERT, C., DENEFLH, B., STEGMAIER, S., HUG, F. & HÄNSCH, G. M. (2004). Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* **103**, 1099-104.

- WAGNER, C., STEGMAIER, S. & HÄNSCH, G. M. (2008). Expression of granzyme B in peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMN), myeloid cell lines and in PMN derived from haematopoietic stem cells in vitro. *Mol Immunol* **45**, 1761-6.
- WAJAPYEYEE, N., SERRA, R. W., ZHU, X., MAHALINGAM, M. & GREEN, M. R. (2008). Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* **132**, 363-74.
- WANG, H., HAMMOUDEH, D. I., FOLLIS, A. V., REESE, B. E., LAZO, J. S., METALLO, S. J. & PROCHOWNIK, E. V. (2007). Improved low molecular weight Myc-Max inhibitors. *Mol Cancer Ther* **6**, 2399-408.
- WIEMANN, B. & STARNES, C. O. (1994). Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* **64**, 529-64.
- WISEMAN, L. R., ADKINS, J. C., PLOSKER, G. L. & GOA, K. L. (1999). Oxaliplatin: a review of its use in the management of metastatic colorectal cancer. *Drugs Aging* **14**, 459-75.
- WRIGHT, S. D., RAMOS, R. A., TOBIAS, P. S., ULEVITCH, R. J. & MATHISON, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431-3.
- XUE, W., ZENDER, L., MIETHING, C., DICKINS, R. A., HERNANDO, E., KRIZHANOVSKY, V., CORDON-CARDO, C. & LOWE, S. W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656-60.
- YAMAMOTO, K., SHIBATA, F., MIYASAKA, N. & MIURA, O. (2002). The human perforin gene is a direct target of STAT4 activated by IL-12 in NK cells. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 1245-52.
- YANG, D., DE LA ROSA, G., TEWARY, P. & OPPENHEIM, J. J. (2009). Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol* **30**, 531-7.
- YOUNG, J. D., LEONG, L. G., LIU, C. C., DAMIANO, A., WALL, D. A. & COHN, Z. A. (1986). Isolation and characterization of a serine esterase from cytolytic T cell granules. *Cell* **47**, 183-94.
- YOUNG, J. L., SUKHOVA, G. K., FOSTER, D., KISIEL, W., LIBBY, P. & SCHÖNBECK, U. (2000). The serpin proteinase inhibitor 9 is an endogenous inhibitor of interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity in human vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* **191**, 1535-44.
- ZACHARSKI, L. R. & SUKHATME, V. P. (2005). Coley's toxin revisited: immunotherapy or plasminogen activator therapy of cancer? *J Thromb Haemost* **3**, 424-7.
- ZENG, R., SPOLSKI, R., FINKELSTEIN, S. E., OH, S., KOVANEN, P. E., HINRICHS, C. S., PISE-MASISON, C. A., RADONOVICH, M. F., BRADY, J. N., RESTIFO, N. P., BERZOFKY, J. A. & LEONARD, W. J. (2005). Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med* **201**, 139-48.
- ZHANG, M., PARK, S. M., WANG, Y., SHAH, R., LIU, N., MURMANN, A. E., WANG, C. R., PETER, M. E. & ASHTON-RICKARDT, P. G. (2006). Serine protease inhibitor 6 protects cytotoxic T cells from self-inflicted injury by ensuring the integrity of cytotoxic granules. *Immunity* **24**, 451-61.
- ZHANG, R., POUSTOVOITOV, M. V., YE, X., SANTOS, H. A., CHEN, W., DAGANZO, S. M., ERZBERGER, J. P., SEREBRIISKII, I. G., CANUTESCU, A. A., DUNBRACK, R. L., PEHRSON, J. R., BERGER, J. M., KAUFMAN, P. D. & ADAMS, P. D. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* **8**, 19-30.
- ZHUANG, D., MANNAVA, S., GRACHTCHOUK, V., TANG, W. H., PATIL, S., WAWRZYNIAK, J. A., BERMAN, A. E., GIORDANO, T. J., PROCHOWNIK, E. V., SOENGAS, M. S. & NIKIFOROV, M. A. (2008). C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. *Oncogene* **27**, 6623-34.
- ZIMMER, S. M., LIU, J., CLAYTON, J. L., STEPHENS, D. S. & SNYDER, J. P. (2008). Paclitaxel binding to human and murine MD-2. *J Biol Chem* **283**, 27916-26.

Annexes

Rattus norvegicus		
Gènes		Séquences
actine	sens	CTGAACCCTAAGGCCAACCGT
	anti-sens	GGAGAGCATAGCCCTCGTAGA
gapdh	sens	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG
	anti-sens	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA
cxcl1	sens	GAGAAAGAAGATAGATTGCACCGATG
	anti-sens	TTCTTCCCGCTCAACACCTTC
cxcl2	sens	GTGACACTGAAGAGTTACGATGTCAG
	anti-sens	CCTGAGGCTCCATAAATGAAAGA
cxcl5 / il-8	sens	AGCGGTTCCATCTCGCCATTTCATGC
	anti-sens	TGAACACTGGCCGTTCTTTCCACTGC
ncf1	sens	TCACCGAGATCTACGAGTTCC
	anti-sens	TCCCATGAGGCTGTTGAAGTAC
ncf2	sens	GAAAGCATGAAGGATGCCTGG
	anti-sens	ATAGCACCAAGATCACATCTCCTTCC
il-2	sens	AAGCAGGCCACAGAATTGAAAC
	anti-sens	CAGATGGCTATCCATCTCCTCAG
il-6	sens	TAGAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAGG
	anti-sens	CATTCATATTGCCAGTTCTTCGTAGAG
il-12	sens	CACTCACATCTGCTGCTCCAC
	anti-sens	CTGGCACGCCACTGAGTACTTC
il-21	sens	ACTCATCTTCTTGGGGACCGTGG
	anti-sens	TACAAATCACAGGAAGGGCATTTCAGC
ifn γ	sens	CTCTTGGATATCTGGAGGAACTGG
	anti-sens	CGACTCCTTTTCCGCTTCCT
mmp3	sens	TTGTCCTTCGATGCAGTCAG
	anti-sens	AGACGGCCAAAATGAAGAGA

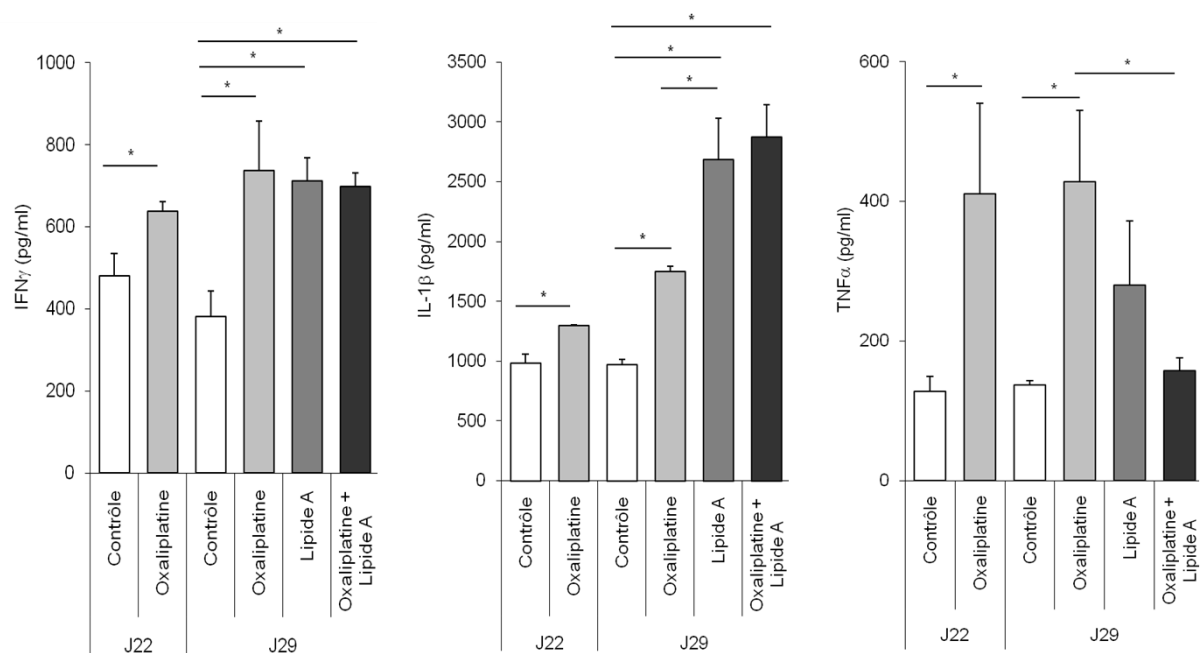
Annexe 1 : tableau des séquences des primers utilisés chez le rat.

Mus musculus		
Gènes		Séquences
gapdh	sens	TTCTTGTGCAGTGCCAGCCTCGTCC
	anti-sens	CCTTTTGGCTCCACCCTTCAAGTGGG
cxcl1	sens	CCCCACTGCACCCAAACCGAAGTCATAGC
	anti-sens	TCAGAAGCCAGCGTTCACCAGACAGGTGC
cxcl2	sens	ACTCCAGCCACACTTCAGCCTAGCG
	anti-sens	ACAGCGAGGCACATCAGGTACGATCC
cxcl5 / il-8	sens	AGCGGTTCCATCTCGCCATTTCATGC
	anti-sens	TGAACACTGGCCGTTCTTTCCACTGC
ncf1	sens	AAGAGCGAGAGCGGCTGGTGGTTTTGC
	anti-sens	TGCTGCAGGAATCGGACGCTGTTGC
ncf2	sens	AGCCGAGCAGGCCTTCACCAAAAGC
	anti-sens	ACGGGCTCGAACAGCTTCTGCTTCC
il-2	sens	CAACAGCGCACCCACTTCAAGCTCC
	anti-sens	AATCCAGAACATGCCGCAGAGGTCC
il-6	sens	TCTGCAAGAGACTTCCATCCAGTTGC
	anti-sens	GACAGGTCTGTTGGGAGTGGTATCC
il-12	sens	AGCGTGGGAGTGGGATGTGTCCTCAGAAGC
	anti-sens	TTGCACCAGCCATGAGCACGTGAACCG
il-21	sens	TCCACAAGATGTAAAGGGGCACTGTGAGC
	anti-sens	ATAGTGTCCGGCGTCTCCTCAGTCC
ifn γ	sens	ACACGCCGCGTCTTGTTTTGCAGC
	anti-sens	GTGGGTTGTTACCTCGAACTTGGCGATGC
mmp3	sens	ACCTAGAAGGAGGCAGCAGAGAACC
	anti-sens	TTCACAATCCTGTAGGTGATGTGGG

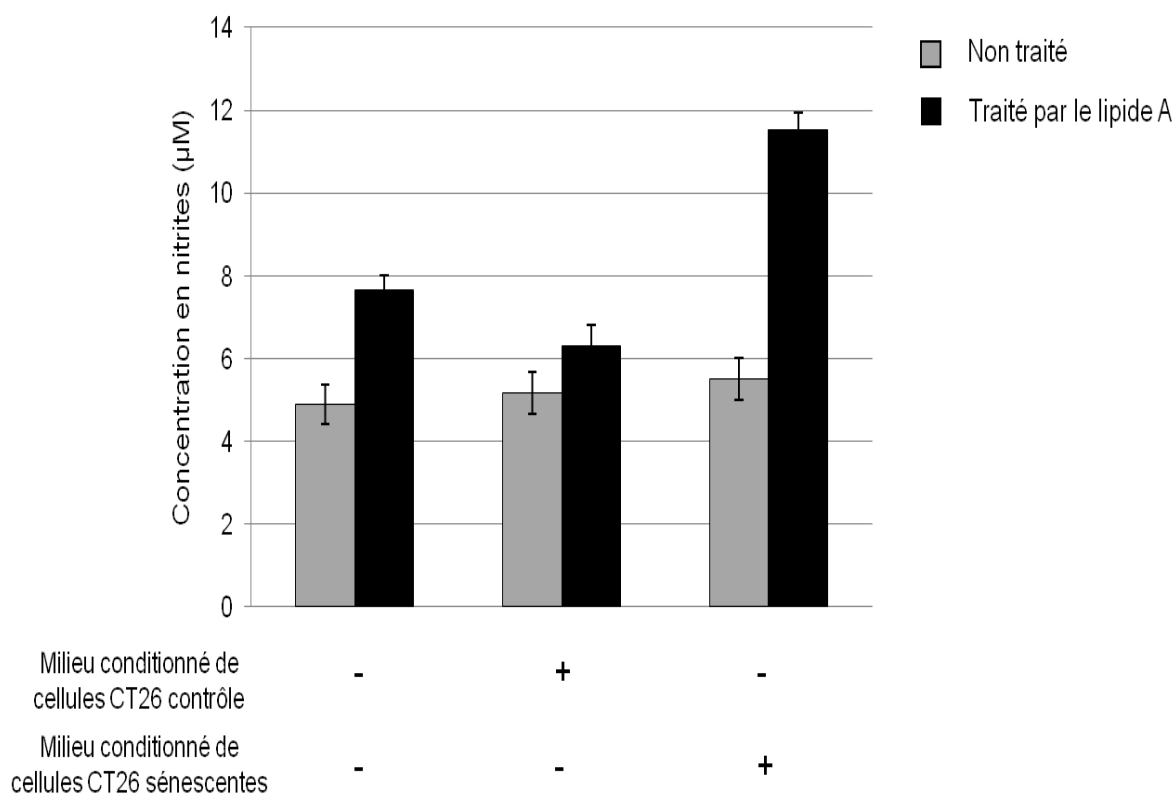
Annexe 2 : tableau des séquences des primers utilisés chez la souris.

Type	Isotype	Spécificité	Fixation	Dilution	Fournisseur
Cytokératine clone MNF116	Souris	Cytokératine	OCT / paraffine	1/50 ^{ème}	Dako Cytomation
Caspase 3 clivée	Lapin	Fragment actif de la caspase 3	OCT	1/100 ^{ème}	Cell Signaling
M30 CytoDEATH	Souris	Forme clivée de la cytokératine 18	OCT	1/10 ^{ème}	Roche
HIS48	Souris	Neutrophiles	OCT / paraffine	1/50 ^{ème}	Santa Cruz
Ly6G	Souris	Neutrophiles	OCT / paraffine	1/100 ^{ème}	BD Transduction
iNOS	Lapin	NOS II	OCT	1/50 ^{ème}	BD Transduction
Arginase 1 Clone 19	Souris	Arginase 1	OCT	1/50 ^{ème}	BD Transduction
Granzyme B	Lapin	Granzyme B	OCT	1/50 ^{ème}	Thermo scientific
NKp46	Chèvre	Cellules NK	OCT	1/100 ^{ème}	R&D Systems
TCR $\alpha\beta$	Souris	Lymphocytes T $\alpha\beta$	OCT	1/100 ^{ème}	AbD Serotec
TCR $\gamma\delta$	Souris	Lymphocytes T $\gamma\delta$	OCT	1/100 ^{ème}	AbD Serotec

Annexe 3 : tableau des anticorps utilisés pour les marquages immunologiques.



Annexe 4 : dosage par E.L.I.S.A. des cytokines inflammatoires IFN γ , IL-1 β et TNF α dans les tumeurs de rats traités ou non. Les tumeurs de rats contrôles (blanc), traités par l'oxaliplatine (gris clair), le lipide A (gris foncé) et la combinaison oxaliplatine / lipide A (noire) ont été prélevées 24h après l'injection d'oxaliplatine ou de sérum physiologique (J22) et 24h après la 1^{ère} injection de lipide A ou de sérum physiologique (J29). Elles ont été lysées et leurs concentrations en cytokines inflammatoires ont été dosées par E.L.I.S.A. *p<0,05, test statistique de Mann Whitney. Figure représentative de 3 expériences indépendantes.



Annexe 5 : dosage de la concentration de nitrite produite par les macrophages péritonéaux cultivés avec les milieux conditionnés de cellules CT26 contrôles ou sénescentes et traités ou non par le lipide A. Des rats non porteurs de tumeurs ont reçu une injection i.p. de thioglycolate, après 3 jours les animaux sont sacrifiés et les macrophages recrutés dans la cavité péritonéale sont récupérés. Ils sont mis en culture avec des milieux conditionnés issus de cellules tumorales CT26 contrôles ou traités pendant 8 jours avec de l'oxaliplatine à 20 µM. Les macrophages sont traités ou non par le lipide A à 10 µg.mL⁻¹ pendant 24h puis la concentration en nitrites des surnageants de culture a été dosée par la méthode de Griess.

Publications :

Martin A., Seigneur C., Scagliarini A., Godard C., Decologne N., Isambert N., Reveneau S., Hammann A., Bataille A., Arnould L., Bettaieb A., Jeannin J.F. and Paul C. **Antitumoral effect of granzyme B from tumor neutrophils.** Soumis.

Martin A., Seigneur C., Paul C., Bettaieb A. and Jeannin J.F. **Toll-like receptor 2 and 4 in cancer immunotherapy : is nitric oxide a mediator ?** 2010. *Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics*. 1: 293-301

Communications orales et sous forme de poster :

Seigneur C., Martin A., Scagliarini A., Godard C., Decologne N., Hammann A., Bataille A., Arnould L.⁴, Bettaieb A., Jeannin J.F., Paul C. **Le Granzyme B des neutrophiles tue les cellules tumorales dans un modèle de régression tumorale induit par un lipide A.** *Forum des jeunes chercheurs*, France, 2013.

Seigneur C., Martin A., Scagliarini A., Godard C., Decologne N., Reveneau S., Hammann A., Bataille A., Arnould L., Bettaieb A., Jeannin J.F. and Paul C. **Neutrophils kill tumor cells via granzyme B in a rat model of colon cancer.** 5^{ème} *Forum du Cancéropole Grand Est*, France, 2011.

Seigneur C., Martin A., Scagliarini A., Godard C., Decologne N., Reveneau S., Hammann A., Bataille A., Arnould L., Bettaieb A., Jeannin J.F. and Paul C. **Les neutrophiles tuent les cellules tumorales via le granzyme B dans un modèle de cancer colique chez le rat.** *Journée Scientifique Centre de Recherche Inserm Lipide-Nutrition-Cancer*, France 2012.

Seigneur C., Martin A., Scagliarini A., Godard C., Decologne N., Reveneau S., Hammann A., Bataille A., Arnould L., Bettaieb A., Jeannin J.F. and Paul C. **Les neutrophiles tuent les cellules tumorales via le granzyme B dans un modèle de cancer colique chez le rat.** *Journée Scientifique IFR100 Santé-STIC*, France, 2011.

Martin A., Seigneur C., Décologne N., Bettaieb A., Jeannin J.F. and Paul C. **Effet synergique de la combinaison oxaliplatine + OM-174 sur la régression tumorale dans un modèle de cancer colique chez le rat.** *13^{ème} Colloque Cytokines du Croisic*, France, 2010.

Martin A., Aissaoui H., Seigneur C., Paul C. and Jeannin J.F. **Effet synergique de la combinaison oxaliplatine + OM-174 sur la régression tumorale dans un modèle de cancer colique chez le rat.** *Forum des jeunes chercheurs*, France, 2009.

Toll Like Receptor 2 and 4 in Cancer Immunotherapy: is Nitric Oxide a Mediator?

*Amandine Martin, Cédric Seignez, Catherine Paul, Ali Bettaieb, & Jean-François Jeannin**

EPHE, Cancer Immunotherapy Laboratory, University of Burgundy, Dijon, France

*Address all correspondence to Jean-François Jeannin, EPHE/INSERM, CRI 866, faculté de médecine, 7 bd Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon, France; Tel. : 33-380653930 ; Fax : 33-380393434 ; jean-francois.jeannin@u-bourgogne.fr

ABSTRACT: The main function of the immune system is to recognize and eliminate pathogens. Recognition of these organisms is done by binding of evolutionary conserved molecules called Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) to specific receptors called Pattern Recognition Receptors (PRRs), such as Toll-Like Receptors (TLRs), which are mainly expressed by immune cells. Tumor cells, which do not produce PAMPs, are therefore able to escape from immune surveillance. Consequently, effective cancer immunotherapies using PRR ligands were developed. Thus the use of Bacillus Calmette-Guérin (BCG), a TLR-2 ligand, and Taxol, a TLR-4 ligand, have become standard cancer immunotherapies. In our laboratory, we have developed an efficient immunotherapy approach in murine models of colon and breast cancers with a lipid A analog, OM-174. After TLR-4 binding, OM-174 induces immune cells recruitment, inflammatory response activation, cytokines secretion, inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression, and nitric oxide (NO) production in tumours. Moreover, although NO is not toxic itself for tumor cells, it could sensitize them to the death-induced by tumor necrosis factor (TNF)-family ligands such as the Fas ligand (FasL), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TNF- α . Thus NO may play a mediator role in efficient immunotherapies based on TLR-2 and TLR-4 activation.

KEY WORDS: tumor immune response, TLR, NO, chemo-immuno-therapy

I. RATIONALE FOR CANCER IMMUNOTHERAPY WITH PAMPS

The concept of immune surveillance is now generally accepted, and the growth of tumors is thought to be a failure of the immune system. The immune response against tumors is mainly a cellular response, starting with the participation of innate immune cells: polynuclear neutrophils, macrophages, and natural killer cells (NK), which kill tumor cells in a major histocompatibility complex (MHC)-independent manner. They provide antigen-presenting cells (APC) with antigens and activating factors, and as a result, APCs are able to activate the adaptive immune cells called helper T (Th) cells and cytotoxic T (Tc) cells, which kill tumor cells specifically after an MHC-dependent recognition.

To generate an effective immune response, APCs require two signals, the first from the antigen and the second from activating factors. For example, in the immune response to microbes, the second signal is provided by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), highly conserved molecules expressed by bacteria, virus and parasites. Tumor cells, as self cells, can not provide any PAMP-like signal as a second signal. Therefore APCs are weakly or not activated and T cells are anergized (Manicassamy & Pulendran, 2009). More recently, however, endogenous molecules have been proposed as second signals because they are mediators of inflammation released in response to tissue damage (Erridge).

This brief and schematic presentation includes current understanding of the pioneering work of W. Coley, who showed that bacterial toxins have anti-tumor activity. Among these toxins, lipopolysaccharides (LPS) were identified as PAMPs, and more particularly, the lipid part (lipid A) was identified as being responsible for the anti-tumor activity. Therefore, an immunotherapy approach would consist of using PAMP motifs to provide the second signal missing signal to activate APCs and the development of an effective immune response.

II. TLR4 AND TLR2 INVOLVEMENT IN CANCER IMMUNOTHERAPIES

Immune cells sense microbes through multiple receptors known as pattern recognition receptors (PRRs), which include the Toll-like receptors (TLRs) that recognize PAMPs. TLRs are highly conserved receptors that recognize a wide range of microbial molecular patterns. They are expressed by different cell types of the immune system and by fibroblasts and epithelial cells. Most TLRs (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 and TLR11) are expressed on the cell surface, whereas the others (TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9) are expressed within the endosomal compartments. Furthermore, TLRs are active as homodimers or as heterodimers (TLR2 + TLR1 or TLR2 + TLR6). Each dimer recognizes different PAMPs and modulates the quality and intensity of immune response.

Among the immunotherapies that are standard treatments for cancer patients, Bacillus Calmette-Guérin (BCG) and Taxols, which are the respective ligands of TLR-2 and TLR-4, (Godaly & Young, 2005; Quesniaux et al., 2004; Simons et al., 2007) are the most commonly used (Herr et al., 1995; Mauri et al., 2009). BCG instillation results in inflammatory response in bladder tissues with infiltration of inflammatory cells and the production of inflammatory factors (Bohle & Brandau, 2003). Taxols are known as cytotoxic drugs that bind to beta-tubulin and prevent mitosis through microtubule overstabilization. Moreover, taxols have been shown to activate the immune response. Treatment of breast cancer with Paclitaxel (taxol) induces an increase in plasma cytokine (interferon-gamma [IFN- γ] and interleukine-6 [IL-6]) concentration and NK cell activity (Pusztai et al., 2004; Tsavaris et al., 2002). Paclitaxel has been shown to bind murine and human TLR4 and MD2 (Zimmer et al., 2008), and it was demonstrated that TLR4 activation by Paclitaxel is responsible for this immune response (Kelly et al., 2006; Takeda, Kaisho & Akira, 2003).

Immunotherapy with the lipid A analog OM-174 in colon and breast cancer models has been developed in our laboratory. OM-174 induces an inflammatory response with the inflammatory cell infiltration of tumors (Larmonier et al., 2004), production of inflammatory cytokines, decrease of TGF- β 1 in tumors (Lagadec et al., 1999), and cure of animals (Onier et al., 1999a). We have demonstrated that the inflammatory response and the anti-tumor effect of OM-174 are mediated by cells that express TLR4.

TLR4 recruits myeloid differentiation factor 88 (MyD-88) or TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β (TRIF) adaptor proteins to activate two independent signaling pathways. The MyD-88 pathway leads to the transcription factor NF- κ B and activating protein-1 (AP-1) activation and the induction of numerous protein expression, including cytokines (IL-1 β , IFN- γ , tumor necrosis factor-alpha [TNF- α], IL-6, IL-10). The TRIF pathway leads to interferon responsive factor-3 (IRF3) and delayed NF- κ B activation, and then to the induction of IFN- β and interferon-inducible protein 10 (IP-10) (Kawai et al., 2001). TLR2 also activates the MyD88 signaling pathway, leading to NF- κ B activation and the activation of proteins including cytokines (Manicassamy & Pulendran, 2009; O'Neill, Bryant & Doyle, 2009).

III. INVOLVEMENT OF NITRIC OXIDE IN BCG? TAXOL AND LIPID A CANCER IMMUNOTHERAPIES

Among the proteins induced by TLR4 and TLR2 is inducible nitric oxide synthase (iNOS), which produces nitric oxide (NO) (Rodriguez et al., 2008; Su et al., 2009), an important inflammatory factor. NO production is predominantly regulated at the transcriptional level of iNOS expression. The transcription of iNOS can be directly induced by TLR4 or TLR2 agonists that signal through NF- κ B, IRF-1, hypoxia inducible factor-1- α (HIF-1 α), and probably AP-1 (Cvetkovic et al., 2004; Jantsch et al., 2008; Nishi et al., 2008). Several other transcription factors, such as signal transducer and activation of transcription-1- α (STAT-1 α), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), and p53, have been described as regulating the activity of the iNOS promoter (Kleinert et al., 2004) but, unlike the previous ones, are not activated by TLR4 or TLR2. Furthermore, the transcription of NOS II can be indirectly induced by TLR4 or TLR2. Furthermore, the transcription of iNOS can be indirectly induced by TLR4 or TLR2 agonists via the cytokines they induce. Indeed, IL-1 β , IFN- γ , and TNF- α activate while IL-10 inhibits iNOS transcription. Therefore, BCG, Taxol and lipid A are able to induce iNOS expression either directly or indirectly (Cvetkovic et al., 2004; Jeannin et al., 1991; Kamijo et al., 1994; Seow et al., 2008).

The involvement of NO in the efficiency of BCG, Taxol (Paclitaxel), or lipid A cancer therapies is not clear. NO production by iNOS is induced (Mitropoulos et al., 2005) or increased (Hosseini et al., 2006) in tumors of patients treated by BCG instillations, but no data are reported to show its involvement in bladder carcinoma. Although Paclitaxel induces low NO production in mouse macrophages, which is increased by IFN- γ , to our knowledge, there are no *in vivo* data available. On the other hand, in a rat model of colon cancer, the lipid A analog OM-174 induced IL-1 β , IFN- γ and NO production in tumors (Onier et al., 1999b) and tumor apoptosis (Onier et al., 1999a). *In vitro*, IL-1 β plus IFN- γ induce iNOS expression and NO production, and tumor cell cytotoxicity is inhibited by N^G-monomethyl L-arginine (NMMA) (Onier et al., 1999b). More convincing experiments were done in mice knocked out for iNOS. Lipid A treatment was successful in knockout mice bearing mammary tumor nodules but not in knockout mice treated with lipid A plus aminoguanidine, suggesting NO production by tumor as the reason for the efficacy of lipid A. However, NO alone is not toxic for these tumor cells, suggesting a sensitization to tumor cell death by NO (unpublished results).

IV. MECHANISM OF THE IMPLICATION OF NO IN TUMOR IMMUNOTHERAPY

Tumor eradication by the immune response involves tumor cell killing, especially by ligands of the TNF family, FasL, TRAIL, and TNF- α , which induce tumor cell apoptosis. However, some tumor cells are resistant to apoptosis *in vitro*. It was shown that NO sensitizes FasL-, TRAIL-, and TNF- α -resistant cells to death (Bauer et al., 2002; Chawla-Sarkar et al., 2003; Garban & Bonavida, 1999; Huerta-Yepez et al., 2004; Lee et al., 2001; Millet et al., 2002; Secchiero et al., 2001). This sensitization could explain the efficiency of BCG, Paclitaxel and lipid A in tumor treatments. First, the tumor cell death observed *in vitro* could occur *in vivo* because BCG instillation increases the infiltration of bladder carcinoma in macrophages expressing FasL and TRAIL and in NK and cytotoxic T cells expressing FasL. Moreover, Fas expression was up-regulated in tumor cells (Mehmut et al., 2005). It was shown that sequential instillations of BCG induce secretion of TNF- α into urine (Jackson et al., 1995) and increase TNF- α positive cells in bladder carcinoma and stroma cells (Sander et al., 1996). Because TNF receptors are constitutively expressed in most tumor cells, production of TNF- α could induce tumor cell apoptosis (Srivastava et al., 1999). Second, the

treatment by Paclitaxel induces apoptosis of breast tumor cells. This effect is mediated, at least in part, by increased expression of FasL (Srivastava et al., 1999), TRAIL, and the TRAIL receptor DR5 (Singh et al., 2003). Finally, Lipid A analogs increased TNF- α concentration in the plasma, which is highest after the first lipid A injection, and declined thereafter following repeated injections. This response, known as tolerance, is not consistent with the necessity to repeat lipid A injections to get an anti-tumor effect, except if tolerance does occur within the tumor (de Bono et al., 2000; Piao et al., 2009). To our knowledge, no report is available regarding the effect of lipid A analogs on FasL/Fas- or TRAIL/DR5-induced tumor cell death.

The molecular mechanism of tumor cell death following sensitization by NO can be explained by post-translational modifications such as S-nitrosylation of either factors (NF- κ B, p53) or proteins that regulate the apoptotic pathway (Jeannin et al., 2008).

V. CONCLUSION

We have discussed whether immunotherapies based on TLR-2 and TLR-4 agonists can be efficient in curing patients with cancer. BCG, Taxols, and Lipid A act through the recruitment of immune cells and the induction of inflammatory pathways. Further investigations are needed to determine if these treatments act by providing APC with antigens and second signal for a full activation. The activation of TLR-2 and -4 pathways leads to the expression of iNOS and NO production, which could sensitize tumor cells to the death induced in vivo by TNF-family ligands. However, the implication of NO in tumor cell death induction in vivo remains to be determined.

REFERENCES

1. Manicassamy, S. and Pulendran, B. (2009) Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin Immunol.* **21**, 185-193
2. Erridge, C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol*
3. Godaly, G. and Young, D. B. (2005) Mycobacterium bovis bacille Calmette Guerin infection of human neutrophils induces CXCL8 secretion by MyD88-dependent TLR2 and TLR4 activation. *Cell Microbiol.* **7**, 591-601
4. Quesniaux, V. J., Nicolle, D. M., Torres, D., Kremer, L., Guerardel, Y., Nigou, J., Puzo, G., Erard, F. and Ryffel, B. (2004) Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol.* **172**, 4425-4434
5. Simons, M. P., Moore, J. M., Kemp, T. J. and Griffith, T. S. (2007) Identification of the mycobacterial subcomponents involved in the release of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand from human neutrophils. *Infect Immun.* **75**, 1265-1271
6. Herr, H. W., Schwalb, D. M., Zhang, Z. F., Sogani, P. C., Fair, W. R., Whitmore, W. F., Jr. and Oettgen, H. F. (1995) Intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy prevents tumor progression and death from superficial bladder cancer: ten-year follow-up of a prospective randomized trial. *J Clin Oncol.* **13**, 1404-1408
7. Mauri, D., Kamposioras, K., Tsali, L., Bristianou, M., Valachis, A., Karathanasi, I., Georgiou, C. and Polyzos, N. P. (2009) Overall survival benefit for weekly vs. three-weekly taxanes regimens in advanced breast cancer: A meta-analysis. *Cancer Treat Rev*
8. Bohle, A. and Brandau, S. (2003) Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol.* **170**, 964-969
9. Tsavaris, N., Kosmas, C., Vadiaka, M., Kanelopoulos, P. and Boulamatsis, D. (2002) Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *Br J Cancer.* **87**, 21-27
10. Pusztai, L., Mendoza, T. R., Reuben, J. M., Martinez, M. M., Willey, J. S., Lara, J., Syed, A., Fritsche, H. A., Bruera, E., Booser, D., Valero, V., Arun, B., Ibrahim, N., Rivera, E., Royce, M., Cleeland, C. S. and Hortobagyi, G. N. (2004) Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy. *Cytokine.* **25**, 94-102
11. Zimmer, S. M., Liu, J., Clayton, J. L., Stephens, D. S. and Snyder, J. P. (2008) Paclitaxel binding to human and murine MD-2. *J Biol Chem.* **283**, 27916-27926
12. Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* **21**, 335-376

13. Kelly, M. G., Alvero, A. B., Chen, R., Silasi, D. A., Abrahams, V. M., Chan, S., Visintin, I., Rutherford, T. and Mor, G. (2006) TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* **66**, 3859-3868
14. Larmonier, C. B., Arnould, L., Larmonier, N., Baumann, S., Moutet, M., Saint-Giorgio, V., Pance, A. and Jeannin, J. F. (2004) Kinetics of tumor cell apoptosis and immune cell activation during the regression of tumors induced by lipid A in a rat model of colon cancer. *Int J Mol Med.* **13**, 355-361
15. Lagadec, P., Raynal, S., Lieubeau, B., Onier, N., Arnould, L., Saint-Giorgio, V., Lawrence, D. A. and Jeannin, J. F. (1999) Evidence for control of nitric oxide synthesis by intracellular transforming growth factor-beta1 in tumor cells. Implications for tumor development. *Am J Pathol.* **154**, 1867-1876
16. Onier, N., Hilpert, S., Arnould, L., Saint-Giorgio, V., Davies, J. G. and Jeannin, J. F. (1999) Cure of colon cancer metastasis in rats with the new lipid A OM 174. Apoptosis of tumor cells and immunization of rats. *Clin Exp Metastasis.* **17**, 299-306
17. Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P. F., Sato, S., Hoshino, K. and Akira, S. (2001) Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol.* **167**, 5887-5894
18. O'Neill, L. A., Bryant, C. E. and Doyle, S. L. (2009) Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev.* **61**, 177-197
19. Su, L., Sun, Y., Ma, F., Lu, P., Huang, H. and Zhou, J. (2009) Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF-kappaB activation and enhancing SOCS1 expression. *Immunol Lett.* **125**, 151-155
20. Rodriguez, N., Lang, R., Wantia, N., Cirl, C., Ertl, T., Durr, S., Wagner, H. and Miethke, T. (2008) Induction of iNOS by *Chlamydia pneumoniae* requires MyD88-dependent activation of JNK. *J Leukoc Biol.* **84**, 1585-1593
21. Jantsch, J., Chakravorty, D., Turza, N., Prechtel, A. T., Buchholz, B., Gerlach, R. G., Volke, M., Glasner, J., Warnecke, C., Wiesener, M. S., Eckardt, K. U., Steinkasserer, A., Hensel, M. and Willam, C. (2008) Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J Immunol.* **180**, 4697-4705
22. Nishi, K., Oda, T., Takabuchi, S., Oda, S., Fukuda, K., Adachi, T., Semenza, G. L., Shingu, K. and Hirota, K. (2008) LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxid Redox Signal.* **10**, 983-995
23. Cvetkovic, I., Miljkovic, D., Vuckovic, O., Harhaji, L., Nikolic, Z., Trajkovic, V. and Mostarica Stojkovic, M. (2004) Taxol activates inducible nitric oxide synthase in rat astrocytes: the role of MAP kinases and NF-kappaB. *Cell Mol Life Sci.* **61**, 1167-1175
24. Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K. and Schwarz, P. M. (2004) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* **500**, 255-266
25. Seow, S. W., Rahmat, J. N., Bay, B. H., Lee, Y. K. and Mahendran, R. (2008) Expression of chemokine/cytokine genes and immune cell recruitment following the instillation of *Mycobacterium bovis*, bacillus Calmette-Guerin or *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in the healthy murine bladder. *Immunology.* **124**, 419-427
26. Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S. I., Kimura, T., Green, S. J. and et al. (1994) Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science.* **263**, 1612-1615
27. Jeannin, J. F., Onier, N., Lagadec, P., von Jeney, N., Stutz, P. and Liehl, E. (1991) Antitumor effect of synthetic derivatives of lipid A in an experimental model of colon cancer in the rat. *Gastroenterology.* **101**, 726-733
28. Mitropoulos, D., Petsis, D., Kyroudi-Voulgari, A., Kouloukoussa, M., Zervas, A. and Dimopoulos, C. (2005) The effect of intravesical *Bacillus Calmette-Guerin* instillations on the expression of inducible nitric oxide synthase in humans. *Nitric Oxide.* **13**, 36-41
29. Hosseini, A., Koskela, L. R., Ehren, I., Aguilar-Santelises, M., Sirsjo, A. and Wiklund, N. P. (2006) Enhanced formation of nitric oxide in bladder carcinoma in situ and in BCG treated bladder cancer. *Nitric Oxide.* **15**, 337-343
30. Onier, N., Hilpert, S., Reveneau, S., Arnould, L., Saint-Giorgio, V., Exbrayat, J. M. and Jeannin, J. F. (1999) Expression of inducible nitric oxide synthase in tumors in relation with their regression induced by lipid A in rats. *Int J Cancer.* **81**, 755-760
31. Garban, H. J. and Bonavida, B. (1999) Nitric oxide sensitizes ovarian tumor cells to Fas-induced apoptosis. *Gynecol Oncol.* **73**, 257-264
32. Millet, A., Bettaieb, A., Renaud, F., Prevotat, L., Hammann, A., Solary, E., Mignotte, B. and Jeannin, J. F. (2002) Influence of the nitric oxide donor glyceryl trinitrate on apoptotic pathways in human colon cancer cells. *Gastroenterology.* **123**, 235-246

33. Lee, Y. J., Lee, K. H., Kim, H. R., Jessup, J. M., Seol, D. W., Kim, T. H., Billiar, T. R. and Song, Y. K. (2001) Sodium nitroprusside enhances TRAIL-induced apoptosis via a mitochondria-dependent pathway in human colorectal carcinoma CX-1 cells. *Oncogene*. **20**, 1476-1485
34. Bauer, J. A., Morrison, B. H., Grane, R. W., Jacobs, B. S., Dabney, S., Gamero, A. M., Carnevale, K. A., Smith, D. J., Drazba, J., Seetharam, B. and Lindner, D. J. (2002) Effects of interferon beta on transcobalamin II-receptor expression and antitumor activity of nitrosylcobalamin. *J Natl Cancer Inst*. **94**, 1010-1019
35. Chawla-Sarkar, M., Bauer, J. A., Lupica, J. A., Morrison, B. H., Tang, Z., Oates, R. K., Almasan, A., DiDonato, J. A., Borden, E. C. and Lindner, D. J. (2003) Suppression of NF-kappa B survival signaling by nitrosylcobalamin sensitizes neoplasms to the anti-tumor effects of Apo2L/TRAIL. *J Biol Chem*. **278**, 39461-39469
36. Huerta-Yepez, S., Vega, M., Jazirehi, A., Garban, H., Hongo, F., Cheng, G. and Bonavida, B. (2004) Nitric oxide sensitizes prostate carcinoma cell lines to TRAIL-mediated apoptosis via inactivation of NF-kappa B and inhibition of Bcl-xl expression. *Oncogene*. **23**, 4993-5003
37. Secchiero, P., Gonelli, A., Celeghini, C., Mirandola, P., Guidotti, L., Visani, G., Capitani, S. and Zauli, G. (2001) Activation of the nitric oxide synthase pathway represents a key component of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated cytotoxicity on hematologic malignancies. *Blood*. **98**, 2220-2228
38. Mehmüt, M., Takeda, K., Abe, M., Ogata, H., Hirose, S., Okumura, K. and Fujime, M. (2005) Fas ligand and TNF-related apoptosis-inducing ligand induction on infiltrating lymphocytes in bladder carcinoma by bacillus Calmette-Guerin treatment. *Urol Int*. **75**, 80-87
39. Jackson, A. M., Alexandroff, A. B., Kelly, R. W., Skibinska, A., Esuvaranathan, K., Prescott, S., Chisholm, G. D. and James, K. (1995) Changes in urinary cytokines and soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy. *Clin Exp Immunol*. **99**, 369-375
40. Sander, B., Damm, O., Gustafsson, B., Andersson, U. and Hakansson, L. (1996) Localization of IL-1, IL-2, IL-4, IL-8 and TNF in superficial bladder tumors treated with intravesical bacillus Calmette-Guerin. *J Urol*. **156**, 536-541
41. Srivastava, R. K., Sasaki, C. Y., Hardwick, J. M. and Longo, D. L. (1999) Bcl-2-mediated drug resistance: inhibition of apoptosis by blocking nuclear factor of activated T lymphocytes (NFAT)-induced Fas ligand transcription. *J Exp Med*. **190**, 253-265
42. Singh, T. R., Shankar, S., Chen, X., Asim, M. and Srivastava, R. K. (2003) Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma in vivo. *Cancer Res*. **63**, 5390-5400
43. de Bono, J. S., Dalglish, A. G., Carmichael, J., Diffley, J., Lofts, F. J., Fyffe, D., Ellard, S., Gordon, R. J., Brindley, C. J. and Evans, T. R. (2000) Phase I study of ONO-4007, a synthetic analogue of the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharide. *Clin Cancer Res*. **6**, 397-405
44. Piao, W., Song, C., Chen, H., Diaz, M. A., Wahl, L. M., Fitzgerald, K. A., Li, L. and Medvedev, A. E. (2009) Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN-beta-dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling. *J Leukoc Biol*. **86**, 863-875
45. Jeannin, J. F., Leon, L., Cortier, M., Sassi, N., Paul, C. and Bettaieb, A. (2008) Nitric oxide-induced resistance or sensitization to death in tumor cells. *Nitric Oxide*. **19**, 158-163

Neutrophils kill tumor cells via granzyme B in models of colon cancer

Amandine Martin^{*1}, Cédric Seignez^{*1}, Alessandra Scagliarini¹, Cindy Godard¹, Nathalie Decologne¹, Nicolas Isambert^{1, 4}, Sylvie Reveneau¹, Arlette Hammann², Amandine Bataille³, Laurent Arnould⁴, Ali Bettaieb¹, Jean-François Jeannin¹, Catherine Paul^{1, 5}

*These authors contributed equally to this work.

Short title: Antitumor effect of neutrophils

¹ EPHE Cancer Immunotherapy Laboratory, Dijon, F-21000, France; EA7269 EPHE-University of Burgundy, Dijon, F-21000, France; University of Burgundy, Dijon, F-21000, France

² INSERM UMR 866 Dijon, F-21000, France; University of Burgundy, Dijon, F-21000, France

³ CellImaP SFR100 Santé STIC; University of Burgundy, Dijon, F-21000, France

⁴ Centre GF Leclerc, Dijon, F-21000, France

⁵ Corresponding author: Catherine Paul, Laboratoire EPHE, Faculté de Médecine, 7 bd Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon, France.

Tel.: 33 3 80 39 34 19

Fax: 33 3 80 39 34 34

catherine.paul@u-bourgogne.fr

Total number of characters in this manuscript: 22 892

Abstract

Immunotherapy with a Lipid A (LipA), an agonist of TLR4, was effective in curing or delaying tumor growth in models of rat and mouse colon cancer, respectively. This treatment caused increases in CXCL1 and CXCL2 levels and tumor invasion by neutrophils. The antitumor efficacy of LipA was impaired when neutrophils were inhibited from infiltrating tumors. Granzyme B (GZMB) was expressed in tumor-associated neutrophils, a process dependent on the tumor microenvironment, and was released after LipA treatment leading to tumor cell death. Inhibition of GZMB function by overexpressing serpin B9, a physiological inhibitor of GZMB, in tumor cells abrogated the anti-tumor effect of LipA. A cocktail of cytokines detected in the tumor microenvironment, namely IL2, IL12, IL21 and interferon γ , was demonstrated to trigger GZMB expression in neutrophils from spleens of tumor-bearing animals. Importantly, neutrophils expressing GZMB were also detected in tumors of patients with colon cancer. These results identify GZMB-expressing neutrophils as a key driver of LipA-mediated colon cancer regression in rat and mouse models of colon cancer and the molecular mechanisms involved may provide novel approaches for human therapeutic intervention.

Introduction

A well-known example of cancer immunotherapy in use for more than 30 years is the Bacillus Calmette-Guérin (BCG) therapy of non-invasive bladder carcinomas. This is currently the most effective immunotherapy for solid tumors, perhaps the only one (Sylvester et al., 2002). The molecular mechanisms involved are likely dependent on the binding of BCG, an avirulent strain of *Mycobacterium bovis*, to the Toll-like receptors (TLR) 4 (Heldwein et al., 2003). This TLR play a critical role in the activation of immune system by stimulating antigen uptake and presentation, maturation of dendritic cells (DC), differentiation of helper T cells, and inhibition of regulatory T cells (Wang et al., 2008).

TLR4 are the classic receptors of lipopolysaccharides (LPS) and lipid A molecules (Takeuchi et al., 1999), the lipid part of LPS to which the anti-tumor activity of LPS was attributed (Parr et al., 1973). However LPS and natural forms of lipid A are too toxic to be used in clinic. Lipid A analogs have been developed and some of them, like OM-174 (LipA), are well tolerated by patients (Isambert et al., 2013) and effective against tumors in animal models. LipA is a triacyl diglucosamine diphosphate acting through TLR4 to induce total regression or growth inhibition of macroscopic tumors in rat and mouse models (Gautier et al., 2010; Onier et al., 1999a; Onier et al., 1999b).

Immunotherapy results in tumor cell death. Granzymes, known to induce apoptosis, are the main mediators of cytotoxicity induced by cytotoxic T lymphocytes and natural killer (NK) cells (Afonina et al., 2010; Cullen and Martin, 2008). Over the past decade, there were some controversy about granzymes A and B expression in other cell types like neutrophils. Some reports show that granzymes are constitutively expressed in human blood neutrophils (Hocheegger et al., 2004; Wagner et al., 2004) or transformed neutrophils in culture (Wagner et al., 2008), while others indicate that granzymes are not at all expressed in neutrophils

(Grossman and Ley, 2004; Metkar and Froelich, 2004). The same controversy was extended to granzyme expression in mouse neutrophils (Martin et al., 2005). Granzyme B (GZMB) expression in tumor neutrophils has not been studied. Even though neutrophils are known to support tumor growth by producing angiogenic factors like matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor (Nozawa et al., 2006), recent data demonstrate that the microenvironment can alter neutrophil activity. For example, blocking transforming growth factor beta (TGF- β 1) induced the switch of neutrophils from a pro-tumorigenic (N2) to an anti-tumorigenic (N1) state (Fridlender et al., 2009).

As neutrophils have been implicated in the mechanism of action of BCG immunotherapy (Kemp et al., 2005; Rosevear et al., 2009; Suttman et al., 2006), we sought to elucidate their role in LipA immunotherapy in rat and mouse models of colon cancer and we checked that human neutrophil exhibited the same properties.

Material and Methods

Cell culture. Colon cancer PROb cells were obtained from a colon carcinoma induced in BD-IX rat (Martin et al., 1983). Mouse colon cancer CT26 cells were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were maintained at 37°C respectively in HAM's F10 (Lonza) and RPMI (Lonza) supplemented with 10% FBS (Lonza). CT26 cells were stably transfected by calcium phosphate method (Kingston et al., 2001) with the pCMV6-Kan:Neo expression plasmid containing the full-length SerpinB9 cDNA (OriGene). Clonal populations of CT26 overexpressing serpinB9 were selected by isolation of a single cell into a well of a 96-well plate and were cultured with medium supplemented with neomycin at 1 mg/ml.

Animal tumor models. BD-IX rats, 2-3 month-old males, and Balb/C mice, 6-8 week-old females, were purchased from Charles River Laboratory (L'Arbresle). Carcinomatosis in BD-IX rats was initiated by i.p. injection of colon cancer cells PROb (Jeannin et al., 1991; Martin et al., 1983). As previously described (Onier et al., 1999a), 14 days later, when the size of tumor nodules were around 2 to 5 mm in diameter, immunotherapy treatment began and consisted of 15 i.v. injections of LipA at 1 mg/kg or of physiological solution (in control rats), at the rate of 3 injections per week. Tumors in Balb/C mice were initiated by s.c. injection of $5 \cdot 10^5$ CT26 cells. The treatment began at day 3 and consisted of 5 i.v. injections of LipA at 8 mg/kg or physiological solution (in control mice) every 5 day. Inhibitors of neutrophils, SB225002 (Tocris Bioscience) and Ly6G antibodies (BioXCell) were injected i.p. at respectively 4 and 5 mg/kg the day before and at the same time that LipA injections. The studies were reviewed and approved by the Burgundy University ethics committee for animal experimentation.

Lipid A analog. OM-174 (OM-Pharma, Meyrin, Switzerland), is a 2-deoxy-6-O-[2-deoxy-2-[(R)-3-dodecanoyloxytetra decanoylamino]-4-O-phospho- β -D-glucopyranosyl]-2-[(R)-3-hydroxytetradecanoylamino]- α -D-glycopyranosyl dihydrogenphosphate.

Antibodies and reagents. Mouse antibody (Ab) HIS48 (Santa Cruz) was used to characterize tumor-infiltrating and purified rat neutrophils. Mouse anti-TCR α/β Ab (AbD Serotec), goat anti-NKp46 Ab (R&D Systems) and mouse anti-TCR γ/δ Ab (AbD Serotec) were used to detect α/β T lymphocytes, NK cells and γ/δ T lymphocytes respectively in tumors. Tumor cells were characterized using a mouse anti cytokeratin antibody (DakoCytomation). The following Abs were also used: a mouse anti-arginase 1 Ab and a rabbit anti-iNOS Ab (BD Transduction Laboratories), a rabbit anti-cleaved caspase-3 Ab (Cell Signaling), a mouse anti-M30 fragment (Roche) and a rabbit anti-granzyme B Ab (Thermo Scientific). Secondary Abs used were anti-mouse or anti-rabbit Alexa Fluor 568 or 488 conjugates from Molecular Probes (Invitrogen). GZMB inhibitor 1 (z-AAAd-CMK) was purchased from Merck. The following cytokines were added to neutrophil cultures: recombinant rat IL-2 (Biolegend), recombinant mouse IL-21 (eBioscience), IL-12 and IFN- γ (R&D Systems).

Detection of CXCL1 and CXCL2 by Ab array. Tumors were harvested, lysed in buffer [1% NP-40, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 2mM EDTA, protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics)] and an equal amounts of proteins (Dc Protein Assay kit (BioRad) were incubated with rat cytokine array membranes (R&D Systems). The revelation was performed according to the manufacturer's protocol. Arrays were scanned as digital images and optical density was measured with ImageJ software.

RT-PCR. Total RNA was extracted from tumors using the RNeasy kit (Qiagen). RT-PCR were performed with the Qiagen OneStep RT-PCR kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. CXCL-1(f), 5'-GAGAAAGAAGATAGATTGCACCGATG-3'; CXCL-1(r), 5'-TTCTTCCCGCTCAACACCTTC-3'; CXCL-2(f), 5'-GTGACACTGAAGAGTTACGATGTCAG-3'; CXCL-2(r), 5'-CCTGAGGCTCCATAAATGAAAGA-3'; IL-2(f), 5'-AAGCAGGCCACAGAATTGAAAC-3'; IL-2(r), 5'-CAGATGGCTATCCATCTCCTCAG-3'; IL-12(f), 5'-CACTCACATCTGCTGCTCCAC-3'; IL-12(r), 5'-CTGGCACGCCACTGAGTACTTC-3'; IL-21(f), 5'-CAGCTCCACAAGATGTAAAGGGGC-3'; IL-21(r), 5'-CCATGTGCCTCTGTTTATTCCTGTCC-3'; IFN γ (f), 5'-CTCTTGGATATCTGGAGGAACTGG-3'; and IFN γ (r), 5'-CGACTCCTTTTCCGCTTCCT-3'; Ncf1 (f), 5'-CACCGAGATCTACGAGTTCC-3'; and Ncf1 (r) 5'-TCCCATGAGGCTGTTGAAGTAC-3'; Ncf2 (f) 5'-GAAAGCATGAAGGATGCCTGG-3'; and Ncf2 (r) 5'-ATAGCACCAAGATCACATCTCCTTCC-3'. To standardize the cDNA samples, expression of the housekeeping gene *gapdh* was tested with primer pair (f) 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3' and (r) 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'. All primers were synthesized by Invitrogen. The PCR products were analyzed by gel electrophoresis (1.5% agarose) and stained with ethidium bromide (Invitrogen). The amplified cDNA length was evaluated using the 100-bp DNA ladder (Promega). All densitometric analyses were performed with ImageJ software.

ELISA. Granzyme B concentrations in spleen neutrophil supernatants were detected by ELISA (Usen Life Science Inc) according to the manufacturer's protocol. Absorbance was read on a spectrophotometer (Asys UVM 340) at 450 nm wavelength.

Histopathology. Paraffin-embedded samples were cut into 5 μm thick. Sections were deparaffined, rehydrated and stained with hematoxylin-eosinY (HE) or May-Grünwald Giemsa (MGG).

Immunohistofluorescence (IHF) and immunofluorescence (IF). For IHF, fixed tumors were embedded in *OCT* (Labonord) after impregnation with 20% sucrose/PBS. Sections were cut into 5 μm thick and fixed for 10 min in cold acetone. Antigen retrieval was performed (citrate buffer pH 7.3, 96°C, 20 min) before the blocking of nonspecific sites with 3% BSA. For IF, neutrophils (10^4) were plated in Lab-Tek II (Nalge Nunc), fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized in 0.2% Triton X-100 and incubated with 3% BSA. Slides for IHF and IF were also incubated with primary antibodies in 1% BSA in PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS), then with appropriate secondary antibodies in 1% BSA in PBS-T. Slides were mounted using Prolong Gold (Invitrogen). Images from rat or mouse colon cancer were captured on a Nikon Eclipse E400 epifluorescent microscope at 40x magnification, images from human colon cancer were captured on a Axio Imager 2 microscope with Axiovision software.

Apoptotic cell detection. Apoptotic cells were detected by TUNEL using ApopTag plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore) according to the manufacturer's protocol.

Neutrophil isolation and culture. Neutrophils were purified from spleens after mashing through a cell strainer (BD Biosciences), removing of red blood cells by osmotic lysis and purification with Ab-anti HIS48 coupled to magnetic beads (Miltenyi Biotec, France).

Neutrophils (98% purity) were cultivated in Ham's F-10 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin B (Lonza). Neutrophils were pretreated for 18 h with 1 ng/mL recombinant IL-2, 1 ng/mL IL-12, 100 ng/mL IL-21 and 250 U/mL IFN- γ before treatment for 6 h with or without 10 μ g/mL OM-174.

Methylene blue toxicity assays. After 24 h the supernatants from the above neutrophil cultures were collected and added to 2×10^4 PROb cells that were then treated with or without 50 μ M GZMB inhibitor-1 in 96-well microplates for 24 h. The cytotoxicity of neutrophil conditioned media to PROb cells was evaluated using the methylene blue assay as previously described (Gautier et al., 2010).

Statistical analyses. Experimental data are expressed as means \pm SEM. Statistical analysis was performed using StatView software. The Mann-Whitney *U* test was used to compare data between two treatment groups. Differences were considered statistically significant as follows: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; and ***, $P \leq 0.005$.

Results

The antitumor effect of the LipA treatment requires the infiltration of tumors by neutrophils. The LipA treatment induced the regression of tumors and cured 95% of tumor-bearing rats (Fig. 1A). Typical structures of tumors after the second injection of physiological solution (control) or LipA are shown after hematoxylin-eosin Y (HE) staining (Fig. 1B). Both types of tumors consisted of core of tumor cells surrounded by a distinct ring of non-tumor cells at the edges of nodules. However, in treated tumors, this ring was thicker than in control tumors (Fig. 1C) and the number of tumor cells decreased drastically (Fig. 1D). We analyzed the cytokine and chemokine contents of tumors using antibody arrays. The largest differences in tumors from treated compared to control rats were detected after the second injection when CXCL1 and CXCL2 were significantly higher (approximately five-fold) in treated rats (Fig. 2A). In agreement tumor *cxc11* and *cxc12* mRNA levels were higher after the first injection of LipA compared to control rats (Fig. 2B). As a consequence, tumors isolated from treated rats contained many more neutrophils than tumors from control rats (Fig. 2, C and D). In agreement, specific neutrophil mRNA transcripts (*ncf1* and *ncf2*) were higher in treated rats compared to control rats (Fig. 2E). However neutrophils remained at the edges of tumor nodules in control rats whereas they infiltrated the entire nodule after LipA treatment (Fig. 2C). Moreover the antitumor effect of LipA in a mouse model of subcutaneous colon cancer was drastically decreased by inhibition of neutrophil recruitment using a CXCR2 antagonist (Fig. 2F) or LY6G antibody (data not shown).

Apoptotic tumor cells are in the vicinity of anti-tumorigenic neutrophils in LipA treated rats. By TUNEL analysis, we found that apoptotic death occurred in cells that were located in the core of treated tumors (Fig. 3A). We confirmed by immunostaining that most apoptotic

cells containing cleaved caspase 3 in treated rats were tumor cells (Fig. 3B). Moreover, double immunostaining of neutrophils and M30 (a marker of apoptotic epithelial cells) demonstrates that in treated tumors the death of tumor cells occurred near neutrophils (Fig. 3C). On the contrary, apoptosis was not detected in control tumors in which neutrophils were at the edges of tumors, distant from tumor cells, and presented a pro-tumorigenic phenotype (N2 state) (Fig. 2C and Fig. 3, D and E). Moreover, analysis of neutrophil activation states showed that LipA induced the acquisition of an anti-tumorigenic phenotype by neutrophils (N1 state) with iNOS expression and low arginase-1 content (Fig. 3, D and E).

The antitumor effect of the LipA treatment requires the transfer of GZMB into tumor cells. GZMB was particularly detected in tumors from treated rats than from control rats. Strikingly, GZMB staining was observed only at the edge of tumor sections from control rats, but throughout the whole tumor sections from treated rats (Fig. 4A) while the presence of GZMB was associated with neutrophils in both treated and control tumors. Moreover, GZMB was found inside tumor cells from treated rats, but not from control rats (Fig. 4B). Further, double immunostaining of GZMB and M30 demonstrates that apoptotic tumor cells in treated rats contained GZMB (Fig. 4C). Taken together, these data suggest that GZMB contributed to tumor cell apoptosis in LipA treated rats. Some other cells were known to express GZMB like NK cells and T lymphocytes ($\alpha\beta$ and $\gamma\delta$). However these cells were present only at the edges of the tumors, none were detected in the core of tumors from control or treated rats (Fig. 5, A, B and C). As we showed that tumor cells were located (Fig. 1C) and died (Fig. 3, A, B and C) in the core of tumor nodules, we deduced that the latter cell types were not involved in tumor cell death in LipA immunotherapy, at least at the beginning of treatment.

Conditioned media of spleen neutrophils from control rats were not cytotoxic (Fig. 6A) and contained less than 5 pg of GZMB/ml (Fig. 6B). GZMB was undetectable in these neutrophils

by immunostaining (Fig. 6C, two upper panels). However, conditioned media from neutrophils treated with LipA in vitro were significantly more cytotoxic causing a 40% decrease in the number of adherent tumor cells (Fig. 6A). They contained six-fold more GZMB than untreated cells (Fig. 6B, left). GZMB was also detected in these neutrophils by immunostaining (Fig. 6C, two lower panels). The cytotoxic effect of conditioned media of LipA treated neutrophils was dependent on GZMB as it was abrogated in the presence of a GZMB inhibitor (Fig. 6A).

Conditioned media of spleen neutrophils from treated rats were 20% more cytotoxic (Fig. 6A) and contained four-fold more GZMB than spleen neutrophils from control rats (Fig. 6B). When these neutrophils were further treated with LipA in vitro, conditioned media showed 40% cytotoxicity (Fig. 6A) and contained twice amount of GZMB (Fig. 6B, right). As previously seen, cytotoxicity was abrogated in the presence of the GZMB inhibitor (Fig. 6A).

Moreover antitumor effect of LipA in mice was highly abrogated by inhibition of granzyme B cytotoxicity with overexpression of serpin B9 in tumor cells (Fig. 6D).

Tumor microenvironment induces granzyme B expression in neutrophils. Cytokines like IL-2, IL-12, IL-21 and IFN- γ were known to play a key role in GZMB production in lymphocytes or NK cells. Different expression patterns of these cytokines were observed in vivo between tumors and spleens in control rats. IL-21 was expressed at similar levels in tumors and spleens. IL-12 mRNA levels were lower whereas IL-2 and IFN- γ mRNA levels were higher in tumors than in spleens (Fig. 7A). Treatment of spleen neutrophils from control rats with an interleukin mix (ILs, IL-2 + IL-12 + IL-21), IFN- γ or ILs plus IFN- γ induced the production of GZMB by neutrophils (Fig. 7B, white bars). As previously observed (Fig. 6, B and C) in the presence of LipA, significant levels of GZMB were produced. While ILs alone

or IFN- γ alone did not enhance the effect of LipA, the combination enhanced the GZMB production induced by LipA (Fig. 7B, grey bars).

Moreover GZMB expression by neutrophils was further extended at humans (Fig. 8), showing that tumor neutrophils from different species expressed GZMB.

Discussion

Here we have demonstrated that GZMB from neutrophils plays an active role in the regression of tumors due to a lipid A analog in models of colon cancer in rat and mouse.

Neutrophils are rarely the focus of research on tumor development or tumor therapies. But given that neutrophils express CXCR1 and CXCR2 at their surface and are recruited by their ligands including CXCL-1 and CXCL-2 (Mantovani et al., 2010) which can be produced by tumor or endothelial cells or fibroblasts (Lazennec and Richmond, 2010), and that CXCL1 and CXCL2 contribute to mobilizing neutrophils from bone marrow and sustain neutrophil recruitment at sites of inflammation (Armstrong et al., 2004; Rittner et al., 2006; Wengner et al., 2008), it was conceivable that neutrophils can be attracted to tumors in this way. We have demonstrated here that the anti-tumoral effect of LipA was associated with a strong increase in CXCL1 and CXCL2 levels in tumors, concomitant with an infiltration of tumors by neutrophils. The expression of CXCL1 and CXCL2 in human colon tumors has been described (McLean et al., 2011; Wen et al., 2006) and there is a report that CXCL1 is highly expressed in poor invasive tumors (Chiu et al., 2005). However descriptions of neutrophils in human colon cancer are few (Roxburgh et al., 2009) without significant correlation with prognosis. As far as we know there has been no correlation made between CXCL1, CXCL2 or neutrophils with the effects of therapy on colon cancer in human. It has been shown that CpG oligodeoxynucleotides and the vascular disrupting agent DMXAA induced the regression of colon tumors in mice, and this correlates with an increase in CXCL1 and neutrophil infiltration in tumors (Sharma et al., 2004; Wang et al., 2009). Furthermore, colon tumor bearing mice receiving cyclophosphamide plus IL-12 gene therapy are more likely to reject tumors when infiltrated by neutrophils (Medina-Echeverez et al., 2011). It is therefore coherent that increased recruitment of neutrophils in treated tumors could be due to CXCL1

and CXCL2. Such an effect has been reported in lungs of mice that have inhaled LPS (Reutershan et al., 2005).

Important question was: are neutrophils involved in the anti-tumor effect of LipA? Inhibition of neutrophil recruitment with CXCR2 antagonist or LY6G antibody (data not shown) caused a drastic decrease in LipA antitumor activity showing that neutrophils were implied in the treatment.

In treated tumors we found neutrophils in the vicinity of apoptotic tumor cells. Apoptotic tumor cells were detected only in treated tumors, but LipA was not directly toxic to tumor cells. Knowing that apoptosis can be induced either by granzymes, or by death effectors, like FasL (Afonina et al., 2010; Guicciardi and Gores, 2009), we sought to ascertain whether neutrophils killed tumor cells via granzyme action. Supporting evidence for this, in rat like in mouse models (data not shown), is that neutrophils and GZMB were located throughout treated nodules, neutrophils and tumor cells contained GZMB, and tumor cells that contained GZMB were dying by apoptosis. Moreover strong demonstration that GZMB was engaged in the antitumor effect of LipA was its abrogation by inhibiting GZMB cytotoxicity through overexpression of serpin B9 in tumor cells.

We noted that GZMB was spontaneously produced in tumors, whether or not the rats were treated with LipA. Moreover GZMB expression was further extended at mice and humans showing that tumor environment induced infiltrating neutrophils from rat, mice and humans to express GZMB.

The distance between GZMB and target cells might be important in regulating cytotoxicity. In control tumors, GZMB was found associated with neutrophils at the edges of nodules but in treated regressing tumors, GZMB and neutrophil densities increased throughout nodules and was found associated with neutrophils and dying tumor cells. Induction of apoptosis by GZMB needs this transfer into tumor cells. As we checked that

PROb tumor cells did not produce GZMB either in vivo or in vitro, whatever the treatment (data not shown) and as neutrophils were the only GZMB producer in the vicinity of tumor cells, we deduce that neutrophils were the main, if not the only cells, able to kill tumor cells via GZMB. This result also highlights the importance of the spatial control of activated neutrophil infiltration into the tumor core in determining the efficacy of LipA tumor therapy.

The influence of the tumor environment might explain why GZMB is produced in neutrophils from control tumors. Little is known about how rat neutrophils are activated to secrete GZMB. NK cells are known to produce GZMB when stimulated with IL-2 and IL-12 in humans, plus IL-21 in mice (Brady et al., 2004; Fehniger et al., 2007; Zhang et al., 2008). Here we compared the expression of cytokines in spleens and tumors of control rats. Although varying in concentration, IL-2, IL-12 and IL-21 (ILs) were all expressed in control tumors. So, we tested their combined effect on spleen neutrophils from control tumor bearing rats. These cells were stimulated to produce GZMB in vitro by ILs alone, IFN- γ alone, and ILs plus IFN- γ . We deduced that these cytokines could also induce the production of GZMB in neutrophils of control tumors. LipA increased the production of GZMB. We have verified that LipA penetrated the tumor nodules in vivo (data not shown), so we conclude that the tumor microenvironment was able to induce the production of GZMB by neutrophils and that LipA was able to increase GZMB production.

It has been proposed that tumor associated neutrophils (TAN) can be classified into two phenotypes depending on their activation state (Fridlender et al., 2009). Type 1 TAN (iNOS⁺, Arg-1^{low}) are anti-tumorigenic, cytotoxic towards tumor cells in vitro. In contrast, type 2 (iNOS⁻, Arg-1^{high}) are pro-tumorigenic and not cytotoxic. Here TAN from control rats fit the type 2 while TAN from LipA treated rats resemble type 1. Moreover bone marrow, blood and spleen neutrophils correspond to type 2 when from control rats and to type 1 when from treated rats (data not shown). We checked that LipA reaches the bone marrow of treated rats

(data not shown), so differentiation from type 2 to type 1 probably occurs in bone marrow and not in the tumor itself. Rather type 1 (treated rats) or type 2 (control rats) neutrophils go on to infiltrate the tumors. There, the microenvironment: cytokines plus LipA for type 1 and cytokines for type 2 neutrophils, induces their differentiation to express GZMB. This defines N1 GZMB⁺ (iNOS⁺, Arg-1^{low}, GZMB⁺) and N2 GZMB⁺ (iNOS⁻, Arg-1^{high}, GZMB⁺) tumor neutrophils.

Overall, we provide strong evidence for the involvement of GZMB produced by neutrophils in immuno-induced tumor regression, widening the field of tumor immunotherapy mechanisms.

Acknowledgments

We thank Valérie Saint-Giorgio for her expert technical assistance.

Financial support: this work was partially supported by grants from Conseil Régional de Bourgogne (Bourgogne Technologies no. 610 002 51 and n° 2008 9201CPERO 002S00431) and from Ligue Contre le Cancer, comité Grand Est. AM was supported by a grant from EPHE, CS by a grant from Conseil Régional de Bourgogne and AS by a grant from INCA.

Author contributions

AM and CS conceived and carried out experiments and analysed data, AS carried out experiments, analysed data and discussed data, CG, ND, SR, AH, AB, LA, NI analysed data, AB discussed data, JFJ conceived experiments, prepared and edited the manuscript, CP conceived experiments, interpreted data, prepared and edited the manuscript, coordinated the experiments, all authors had final approval of manuscript.

References

- Afonina, I.S., S.P. Cullen, and S.J. Martin. 2010. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunol Rev* 235:105-116.
- Armstrong, D.A., J.A. Major, A. Chudyk, and T.A. Hamilton. 2004. Neutrophil chemoattractant genes KC and MIP-2 are expressed in different cell populations at sites of surgical injury. *Journal of leukocyte biology* 75:641-648.
- Brady, J., Y. Hayakawa, M.J. Smyth, and S.L. Nutt. 2004. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol* 172:2048-2058.
- Chiu, S.T., F.J. Hsieh, S.W. Chen, C.L. Chen, H.F. Shu, and H. Li. 2005. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:437-443.
- Cullen, S.P., and S.J. Martin. 2008. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ* 15:251-262.
- Fehniger, T.A., S.F. Cai, X. Cao, A.J. Bredemeyer, R.M. Presti, A.R. French, and T.J. Ley. 2007. Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity* 26:798-811.
- Fridlender, Z.G., J. Sun, S. Kim, V. Kapoor, G. Cheng, L. Ling, G.S. Worthen, and S.M. Albelda. 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16:183-194.
- Gautier, T., C. Paul, V. Deckert, C. Desrumaux, A. Klein, J. Labbe, N. Le Guern, A. Athias, S. Monier, A. Hammann, A. Bettaieb, J.F. Jeannin, and L. Lagrost. 2010. Innate immune response triggered by triacyl lipid A is dependent on phospholipid transfer protein (PLTP) gene expression. *FASEB J* 24:3544-3554.
- Grossman, W.J., and T.J. Ley. 2004. Granzymes A and B are not expressed in human neutrophils. *Blood* 104:906-907; author reply 907-908.
- Guicciardi, M.E., and G.J. Gores. 2009. Life and death by death receptors. *FASEB J* 23:1625-1637.
- Heldwein, K.A., M.D. Liang, T.K. Andresen, K.E. Thomas, A.M. Marty, N. Cuesta, S.N. Vogel, and M.J. Fenton. 2003. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against Mycobacterium bovis BCG. *J Leukoc Biol* 74:277-286.
- Hochegger, K., P. Eller, and A.R. Rosenkranz. 2004. Granzyme A: an additional weapon of human polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in innate immunity? *Blood* 103:1176.
- Isambert, N., P. Fumoleau, C. Paul, C. Ferrand, S. Zanetta, J. Bauer, K. Ragot, G. Lizard, J.F. Jeannin, and M. Bardou. 2013. Phase I study of OM-174, a lipid A analogue, with assessment of immunological response, in patients with refractory solid tumors. *BMC Cancer* 13:172.
- Jeannin, J.F., N. Onier, P. Lagadec, N. von Jeney, P. Stutz, and E. Liehl. 1991. Antitumor effect of synthetic derivatives of lipid A in an experimental model of colon cancer in the rat. *Gastroenterology* 101:726-733.
- Kemp, T.J., A.T. Ludwig, J.K. Earel, J.M. Moore, R.L. Vanoosten, B. Moses, K. Leidal, W.M. Nauseef, and T.S. Griffith. 2005. Neutrophil stimulation with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. *Blood* 106:3474-3482.
- Kingston, R.E., C.A. Chen, and H. Okayama. 2001. Calcium phosphate transfection. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* Chapter 10:Unit 10 13.

- Lazennec, G., and A. Richmond. 2010. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med* 16:133-144.
- Mantovani, A., B. Savino, M. Locati, L. Zammataro, P. Allavena, and R. Bonecchi. 2010. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:27-39.
- Martin, F., A. Caignard, J.F. Jeannin, A. Leclerc, and M. Martin. 1983. Selection by trypsin of two sublines of rat colon cancer cells forming progressive or regressive tumors. *Int J Cancer* 32:623-627.
- Martin, P., R. Wallich, J. Pardo, A. Mullbacher, M. Munder, M. Modolell, and M.M. Simon. 2005. Quiescent and activated mouse granulocytes do not express granzyme A and B or perforin: similarities or differences with human polymorphonuclear leukocytes? *Blood* 106:2871-2878.
- McLean, M.H., G.I. Murray, K.N. Stewart, G. Norrie, C. Mayer, G.L. Hold, J. Thomson, N. Fyfe, M. Hope, N.A. Mowat, J.E. Drew, and E.M. El-Omar. 2011. The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. *PLoS One* 6:e15366.
- Medina-Echeverez, J., J. Fioravanti, M. Zabala, N. Ardaiz, J. Prieto, and P. Berraondo. 2011. Successful colon cancer eradication after chemoimmunotherapy is associated with profound phenotypic change of intratumoral myeloid cells. *J Immunol* 186:807-815.
- Metkar, S.S., and C.J. Froelich. 2004. Human neutrophils lack granzyme A, granzyme B, and perforin. *Blood* 104:905-906; author reply 907-908.
- Nozawa, H., C. Chiu, and D. Hanahan. 2006. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12493-12498.
- Onier, N., S. Hilpert, L. Arnould, V. Saint-Giorgio, J.G. Davies, and J.F. Jeannin. 1999a. Cure of colon cancer metastasis in rats with the new lipid A OM 174. Apoptosis of tumor cells and immunization of rats. *Clinical & experimental metastasis* 17:299-306.
- Onier, N., S. Hilpert, S. Reveneau, L. Arnould, V. Saint-Giorgio, J.M. Exbrayat, and J.F. Jeannin. 1999b. Expression of inducible nitric oxide synthase in tumors in relation with their regression induced by lipid A in rats. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 81:755-760.
- Parr, I., E. Wheeler, and P. Alexander. 1973. Similarities of the anti-tumour actions of endotoxin, lipid A and double-stranded RNA. *Br J Cancer* 27:370-389.
- Reutershan, J., A. Basit, E.V. Galkina, and K. Ley. 2005. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L807-815.
- Rittner, H.L., S.A. Mousa, D. Labuz, K. Beschmann, M. Schafer, C. Stein, and A. Brack. 2006. Selective local PMN recruitment by CXCL1 or CXCL2/3 injection does not cause inflammatory pain. *J Leukoc Biol* 79:1022-1032.
- Rosevear, H.M., A.J. Lightfoot, M.A. O'Donnell, and T.S. Griffith. 2009. The role of neutrophils and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Metastasis Rev* 28:345-353.
- Roxburgh, C.S., A.M. Wallace, G.K. Guthrie, P.G. Horgan, and D.C. McMillan. 2009. Comparison of the prognostic value of tumour- and patient-related factors in patients undergoing potentially curative surgery for colon cancer. *Colorectal Dis* 12:987-994.
- Sharma, S., C.P. Karakousis, H. Takita, K. Shin, and S.P. Brooks. 2004. Cytokines and chemokines are expressed at different levels in small and large murine colon-26 tumors following intratumoral injections of CpG ODN. *Neoplasia* 6:523-528.
- Suttman, H., J. Riemensberger, G. Bentien, D. Schmaltz, M. Stockle, D. Jocham, A. Bohle, and S. Brandau. 2006. Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus

- Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. *Cancer Res* 66:8250-8257.
- Sylvester, R.J., M.A. van der, and D.L. Lamm. 2002. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 168:1964-1970.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443-451.
- Wagner, C., C. Iking-Konert, B. Deneleh, S. Stegmaier, F. Hug, and G.M. Hansch. 2004. Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 103:1099-1104.
- Wagner, C., S. Stegmaier, and G.M. Hansch. 2008. Expression of granzyme B in peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMN), myeloid cell lines and in PMN derived from haematopoietic stem cells in vitro. *Mol Immunol* 45:1761-1766.
- Wang, L.C., L. Thomsen, R. Sutherland, C.B. Reddy, S.M. Tijono, C.J. Chen, C.E. Angel, P.R. Dunbar, and L.M. Ching. 2009. Neutrophil influx and chemokine production during the early phases of the antitumor response to the vascular disrupting agent DMXAA (ASA404). *Neoplasia* 11:793-803.
- Wang, R.F., Y. Miyahara, and H.Y. Wang. 2008. Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene* 27:181-189.
- Wen, Y., S.F. Giardina, D. Hamming, J. Greenman, E. Zachariah, M.D. Bacolod, H. Liu, J. Shia, P.S. Amenta, F. Barany, P. Paty, W. Gerald, and D. Notterman. 2006. GROalpha is highly expressed in adenocarcinoma of the colon and down-regulates fibulin-1. *Clin Cancer Res* 12:5951-5959.
- Wengner, A.M., S.C. Pitchford, R.C. Furze, and S.M. Rankin. 2008. The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood* 111:42-49.
- Zhang, B., J. Zhang, and Z. Tian. 2008. Comparison in the effects of IL-2, IL-12, IL-15 and IFNalpha on gene regulation of granzymes of human NK cell line NK-92. *Int Immunopharmacol* 8:989-996.

Figure legends

Figure 1. LipA cured tumor-bearing rats. (A) The lifespan of tumor-bearing rats was improved by LipA treatment. Fourteen days after i.p. injection of PROb cells, rats were treated i.v. with LipA (grey) or physiological solution (control, black) 3 times per week for 5 weeks. Results are representative of at least 3 independent experiments with 10 animals per group. (B) Hematoxylin-eosin staining of tumors from LipA treated or control rats (scale bars = 200 μm). (C) Enlargement of regions outlined in figure B (scale bars = 50 μm). The tumor core and surrounding ring of cells can be distinguished. (D) Tumor regression was analyzed by immunostaining of tumor cells (anti-cytokeratin Ab, red), one day after the first injection (day 15) or one day after the fourth injection (day 22) of LipA or physiological solution (scale bars = 50 μm). Micrographs are representative of at least 3 independent experiments, 4 animals per group.

Figure 2. Anti-tumor effect of LipA was dependent of neutrophil infiltration. (A) Twenty four hours after the second injection of LipA, tumors from control or LipA treated rats were removed, lysed and the chemokine content analyzed using antibody arrays. The relative abundance of CXCL1 and CXCL2 was determined using Image J software and expressed as a percentage compared to an internal control (100%). Significant difference compared to control rats, $**p < 0.01$ in Mann-Whitney U-test. (B) Six hours after the first injection of LipA or physiological solution (control), tumors were removed and RNA was extracted. Expression levels of cxcl1 and cxcl2 were evaluated relative to housekeeping gene gapdh by RT-PCR. (C) Tumors were collected at day 17 from LipA treated or control rats. After fixation, 5- μm sections were cut and stained for tumor cells (anti-cytokeratin Ab, red) and neutrophils (anti-HIS48 Ab, green) (scale bars = 50 μm). The yellow staining in the merge

panels represents tumor cells very close to neutrophils. Micrographs are representative of at least 3 independent experiments, 4 animals per group. **(D)** The levels of neutrophils present in tumors from control or LipA treated rats were determined by counting of these cells in 3 independent slides per animals, 4 animals per group. Shown are the mean % of neutrophils \pm SEM. **(E)** Twenty four hours after the second injection of LipA or physiological solution (control), tumors were removed and RNA was extracted. Expression levels of *ncf1* and *ncf2* were evaluated relative to housekeeping gene *gapdh* by RT-PCR. **(F)** CT26-bearing mice were treated with physiological solution (control, black), LipA (blue), SB225002 (grey) or SB225002 + LipA (red). Three days after cell injection, LipA was administered i.v. every 5 days for 5 times. SB225002 was injected i.p. 24 h before and at the same time than LipA. Results are representative of at least 2 independent experiments with 10 animals per group. **(A, B, D, E and F)** Significant difference in Mann-Whitney U test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

Figure 3. LipA treatment induced tumor cell death in the vicinity of infiltrated anti-tumorigenic neutrophils. Tumors from LipA treated or control rats were removed at day 17, fixed and cut into 5- μ m cryosections. **(A)** Apoptotic cells were present in the core of tumors from LipA treated rats but not in tumors from control rats (TUNEL, red). **(B)** Immunostaining of tumor cells (anti-cytokeratin Ab, red) and cleaved caspase 3 (anti-cleaved caspase 3 Ab, green). **(C)** Apoptotic tumor cells close to infiltrating neutrophils. Cryosections were stained for apoptotic tumor cells (M30 Ab, red) and neutrophils (anti-HIS48 antibody, green). **(D and E)** Staining for neutrophils (anti-HIS48 Ab, green) and **(D)** iNOS (anti-iNOS Ab, red) or **(E)** arginase-1 (anti-arginase-1 Ab, red). Yellow fluorescence in merge panels is where red and green fluorescences coincide. Micrographs are representative of at least 3 independent experiments, 4 animals per group (scale bars = 50 μ m).

Figure 4. Granzyme B was present in neutrophils and apoptotic tumor cells in LipA treated rats. Tumors from LipA treated or control rats were removed at day 17, fixed, cut into 5- μ m cryosections and stained for neutrophils (anti-HIS48 Ab, red (**A**)), tumor cells (anti-cytokeratin Ab, red (**B**)), or apoptotic tumor cells (anti-M30 Ab, red (**C**)) and GZMB (anti-GZMB Ab, green (**A**, **B** and **C**)). Both neutrophils and tumor cells located in the core of tumors from LipA treated rats contained GZMB (yellow signals in merged panels of (**A** and **B**), respectively). GZMB was present in apoptotic tumor cells in LipA treated rats (yellow signal shown by white arrows in merged panel of (**C**)). Micrographs are representative of at least 3 independent experiments, 4 animals per group (scale bars = 50 μ m).

Figure 5. NK cells, $\alpha\beta$ T or $\gamma\delta$ T lymphocytes remained at the periphery of tumors in LipA treated rats. Tumors from LipA treated or control rats were removed at day 17 and then 5- μ m cryosections were prepared and stained (red) for (**A**) NK cells (anti-NKp46 Ab), (**B**) $\alpha\beta$ T lymphocytes (anti-TCR α/β Ab) or (**C**) $\gamma\delta$ T lymphocytes (anti-TCR γ/δ Ab), and for nuclei (DAPI, blue). Left panels show tumor edges, right panels show tumor cores. Micrographs are representative of at least 3 independent experiments, 4 animals per group (scale bars = 50 μ m).

Figure 6. LipA induced neutrophil-mediated cytotoxicity via granzyme B production. (**A**) Spleens from LipA treated or control rats were removed at day 17 and neutrophils were purified with magnetic beads coupled to an anti-HIS48 Ab. Neutrophils were incubated in vitro with or without 10 μ g/ml LipA for 24 h. The toxic effect of conditioned media on tumor target cells cultured in the presence or in the absence of GZMB inhibitor was evaluated using a methylene blue assay. The mean numbers of adherent cells are shown as percentages of the

untreated cells (100%). **(B)** Neutrophils from control or LipA treated rats obtained as described above were incubated *in vitro* with or without 10 µg/ml LipA for 24 h and the concentration of GZMB in conditioned media was measured by ELISA. Shown are means ± SEM. **(C)** Neutrophils were incubated as in **(B)** and stained for granzyme B (green) or DAPI (blue). 3 independent experiments. **(D)** Three days after s.c. injection of PI9-6 cells, mice were treated i.v. with LipA (grey) or physiological solution (control, black) every 5 days for 5 times. Results are representative of at least 2 independent experiments with 10 animals per group. **(A, B and D)** Significant difference in Mann-Whitney *U* test, **p*<0.05, ***p*<0.01, n.s. not significant.

Figure 7. Tumor cytokines and LipA together induced strong expression of granzyme B in spleen neutrophils. **(A)** Spleens and tumors from control rats were removed at day 17 and RNA was extracted. Expression levels of *il-2*, *il-12*, *il-21* and *ifn-γ* were evaluated by RT-PCR and expressed as the mean of percentage of change compared to the level of *gapdh* expression. **(B)** Neutrophils from spleen were purified as in Figure 6 and incubated for 24 h *in vitro* without or with a cytokine mix (ILs, IL-2 + IL-12 + IL-21) alone, IFN-γ alone or a combination of both (ILs + IFN-g), in the presence or absence of 10 µg/ml LipA for 6 h. Concentration of granzyme B (GZMB) in conditioned media was measured by ELISA. Shown are means ± SEM. 3 independent experiments. **(A and B)** Significant difference in Mann-Whitney *U* test, **p*<0.05, ***p*<0.01.

Figure 8. Granzyme B was also expressed in human tumor neutrophils. Human colon cancer samples were collected, fixed, cut into 5-µm cryosections and stained for neutrophils (anti-CD66b, green), GZMB (anti-GZMB Ab, red) and for nuclei (DAPI, blue). GZMB was

present in neutrophils (yellow signal shown by white arrows in merged panel. Micrographs are representative of at least 20 different samples (scale bar = 50 μm).

Figure 1

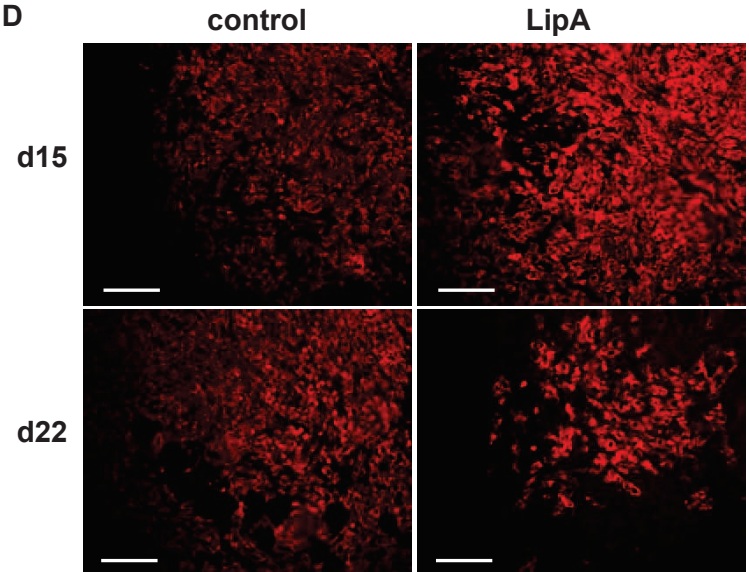
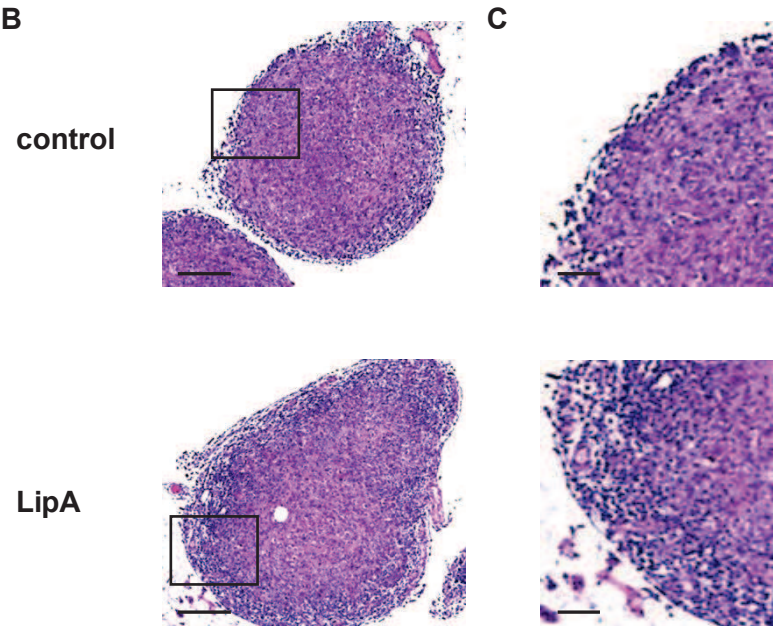
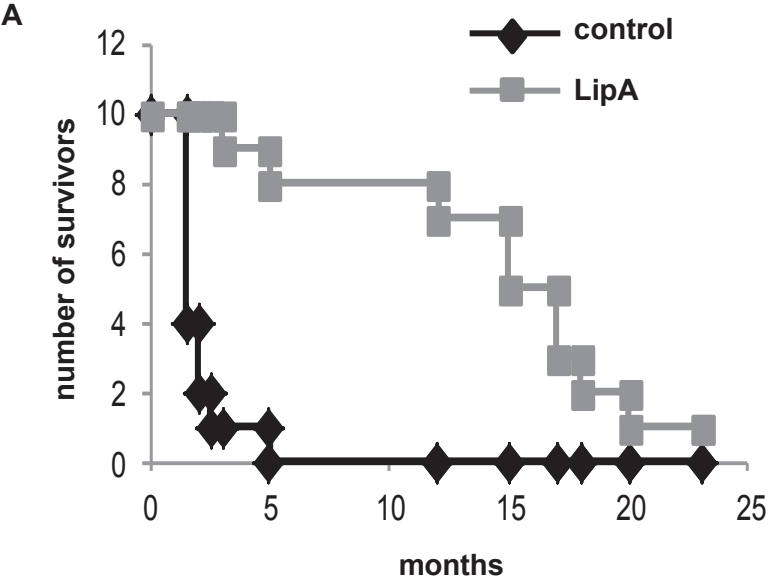


Figure 2

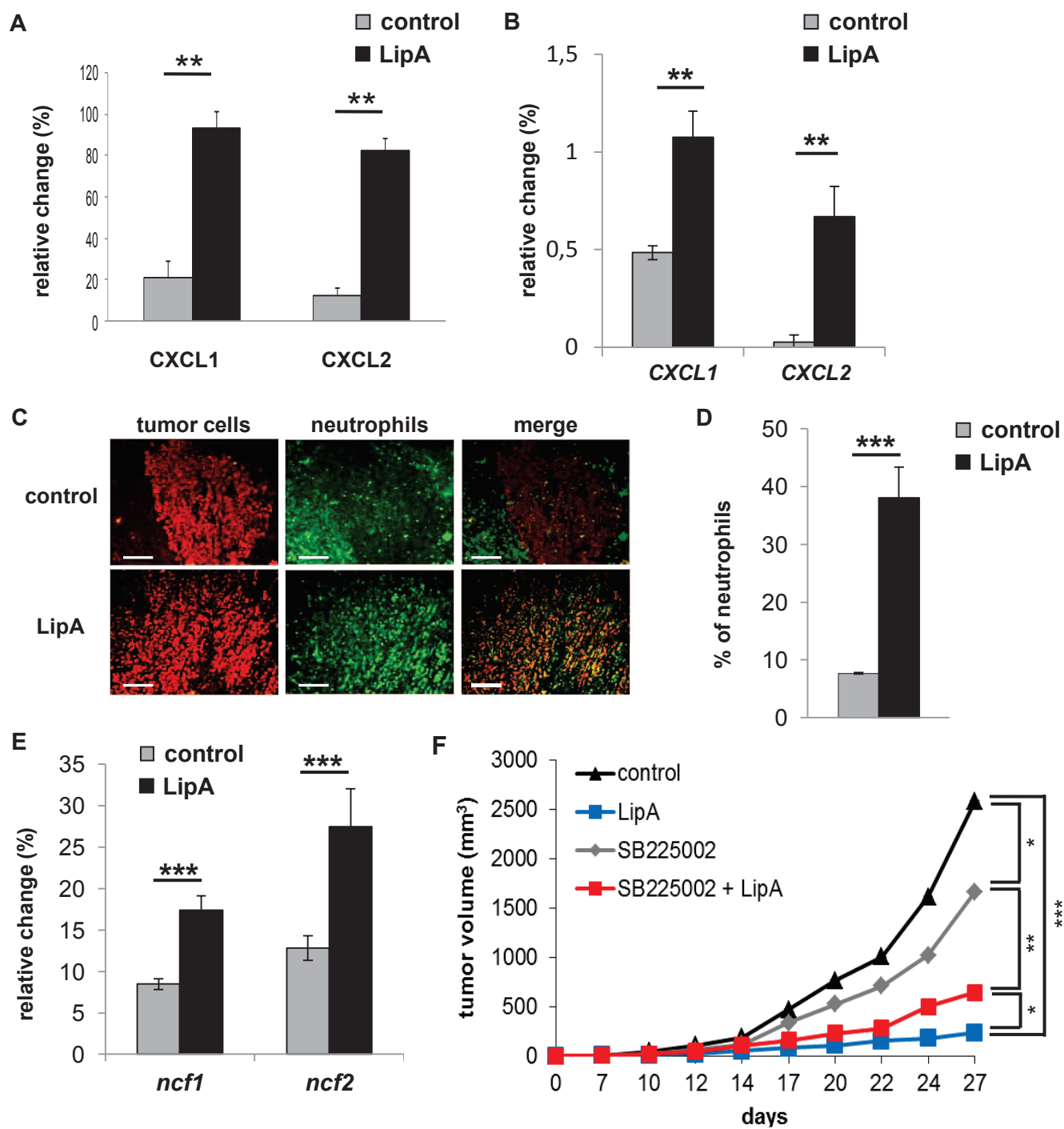


Figure 3

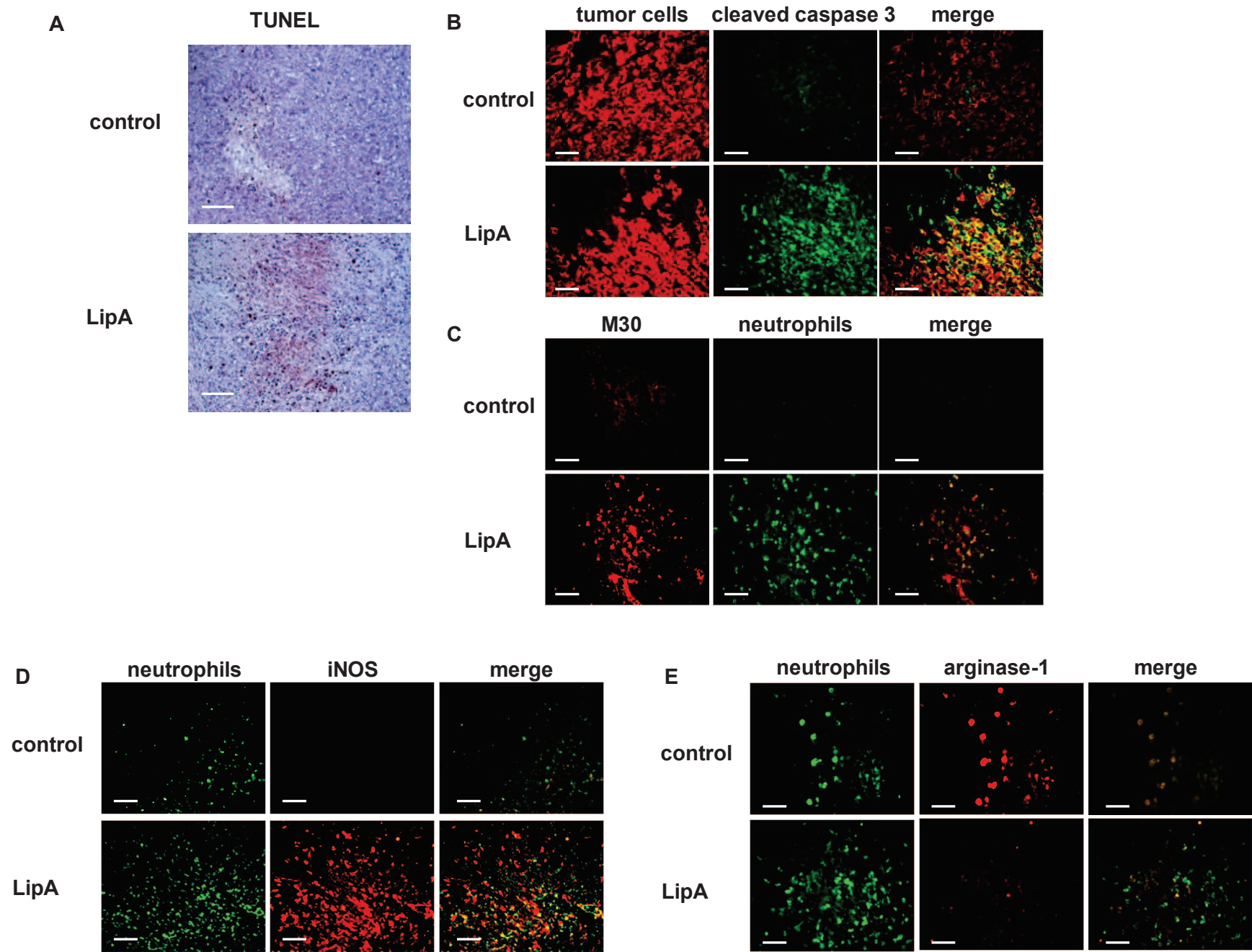


Figure 4

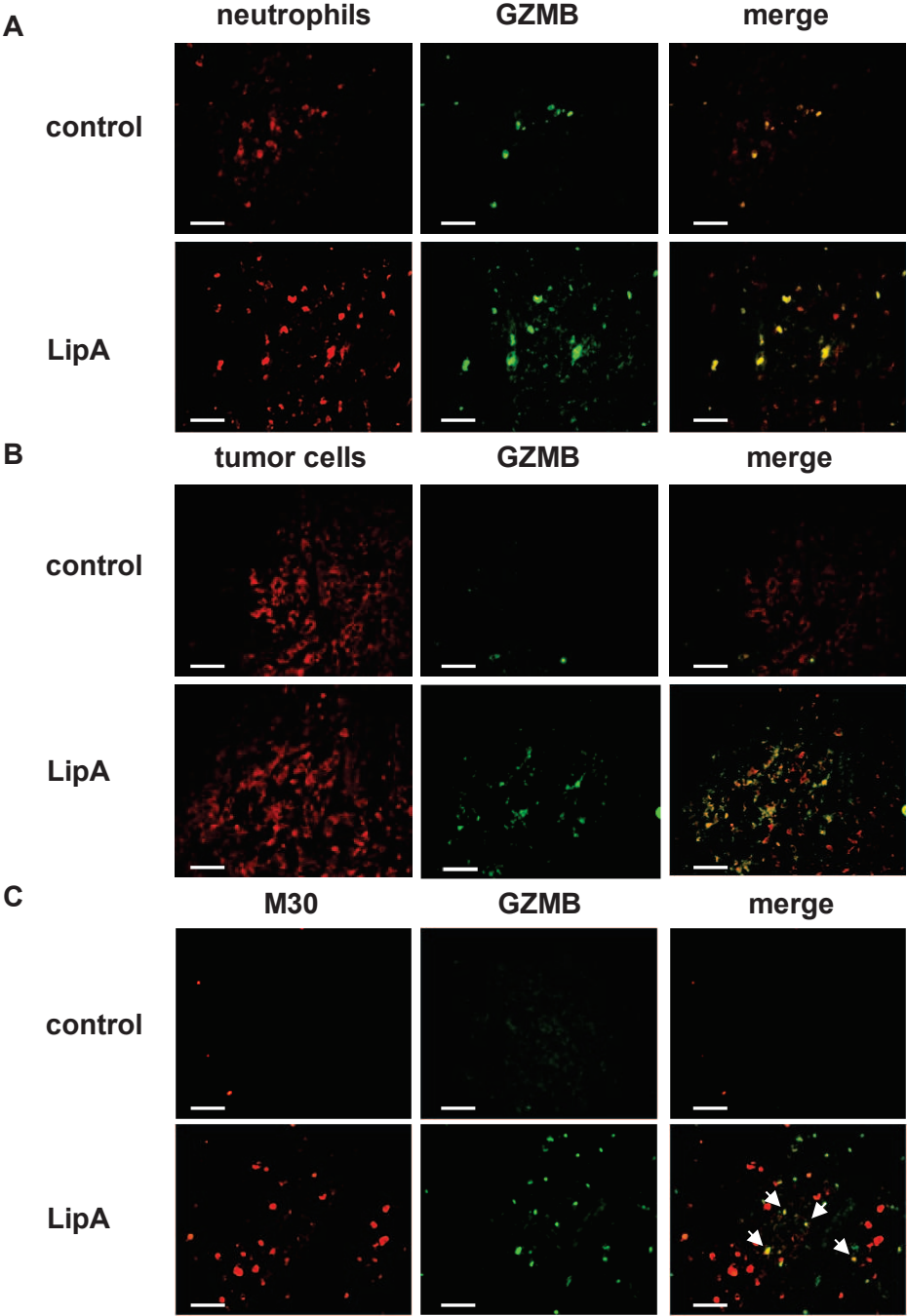


Figure 5

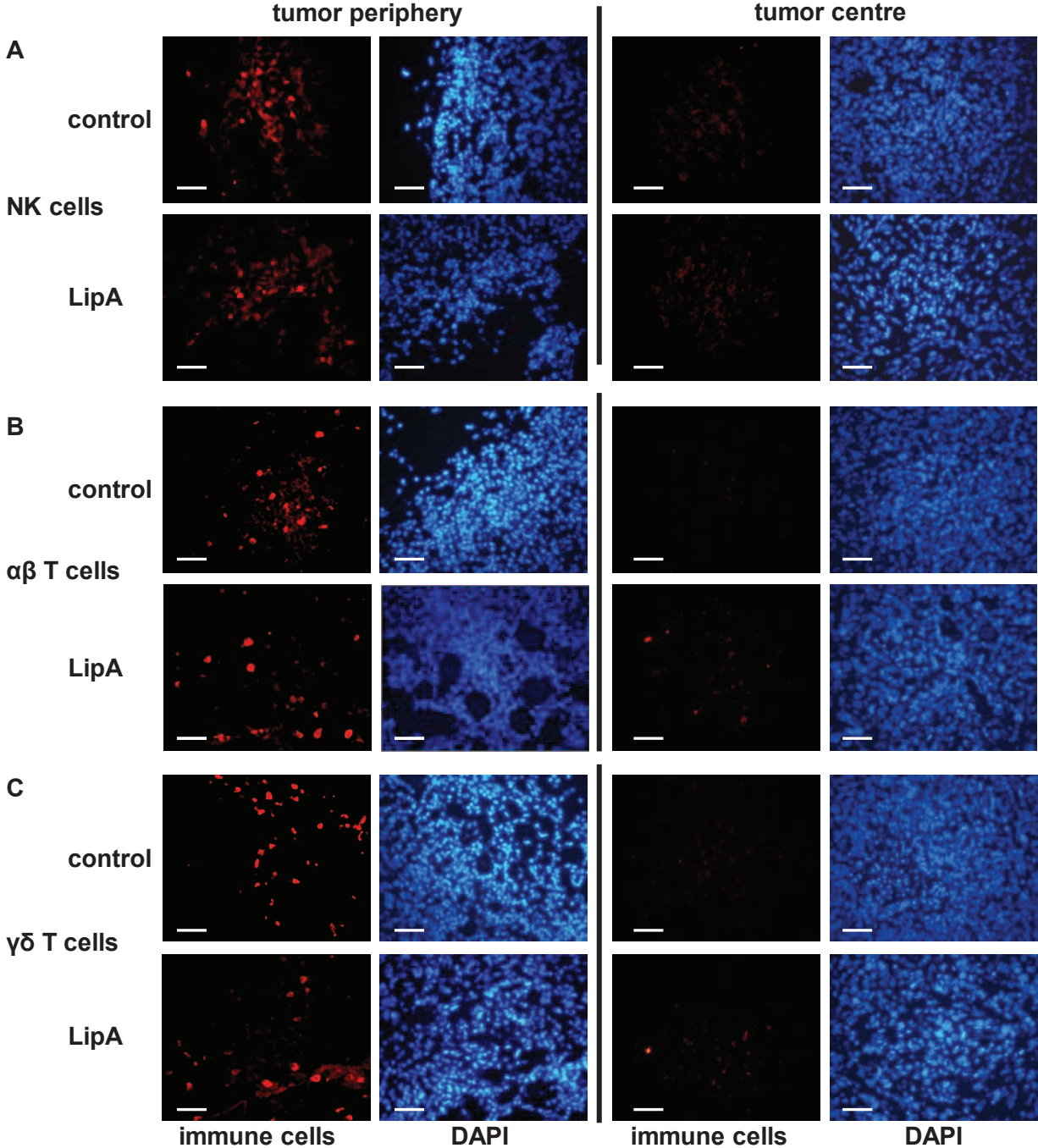


Figure 6

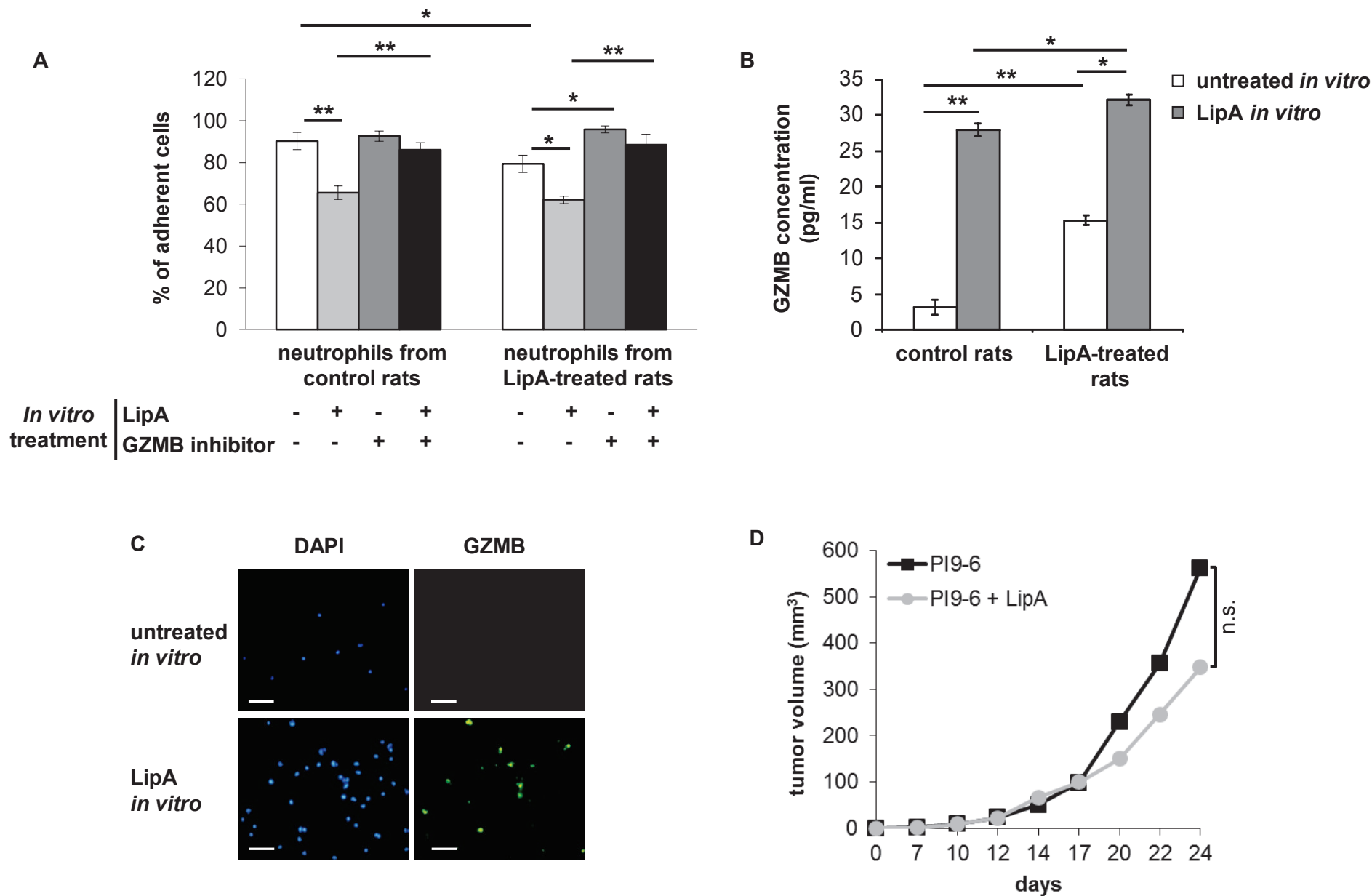


Figure 7

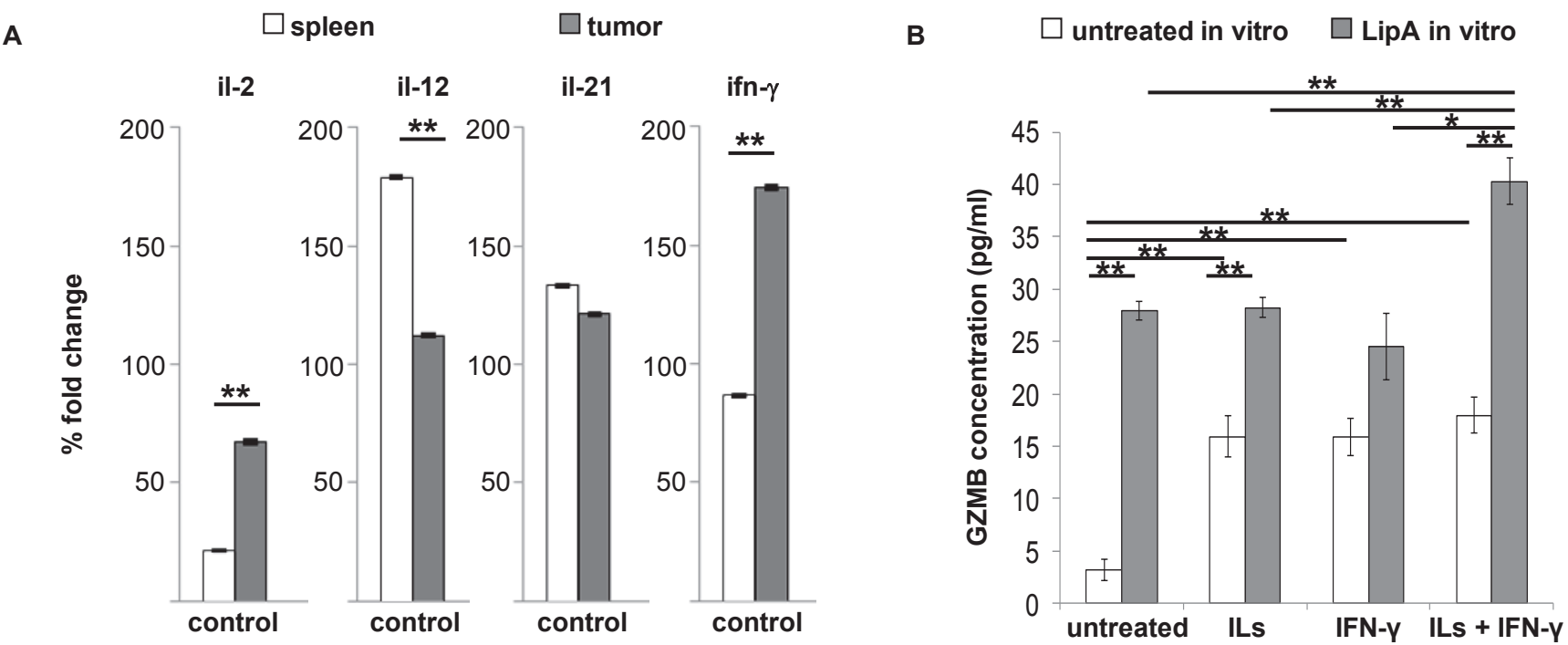


Figure 8

